GLUTATHIONPEROXIDASE

Kristallisation, Selengehalt, Aminosäurezusammensetzung und Modellvorstellungen zum Reaktionsmechanismus

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Wolfgang Amandus Günzler
aus Tübingen

1974

74 136

GLUTATHIONPEROXIDASE

Kristallisation, Selengehalt, Aminosäurezusammensetzung und Modellvorstellungen zum Reaktionsmechanismus

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Wolfgang Amandus Günzler
aus Tübingen

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	1. März 1974
Dekan:	Prof. Dr. E. Bayer
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. L. Flohé
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. G. Weitzel

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. L.Flohé im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt (Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Weitzel).

An dieser Stelle möchte ich Herrn Dr.L.Flohé für die Überlassung des Themas und insbesondere für die intensive Betreuung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Untersuchungen danken.

Frau Dr. A. Fretzdorff schulde ich Dank für die Durchführung der Aminosäureanalysen. Für die Durchführung der Neutronenaktivierungsanalysen danke ich Herrn Dr. H. H. Schock von der Geochemischen Abteilung des Mineralogischen Instituts der Universität Tübingen.

Frau I. Müller und Herrn Dr. H. Vergin möchte ich für ihre Hilfe bei der kinetischen Untersuchung mit verschiedenen Hydroperoxiden danken. Herrn Dipl. Biochem. G. Loschen danke ich für seine Unterstützung bei der Anwendung der "Rapid-Flow-Technik".

Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel als Institutsdirektor danke ich für sein Verständnis, das zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

INHALTSÜBERSICHT

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	EIGENSCHAFTEN VON GLUTATHIONPEROXIDASE	2
1.1.1.	Vorkommen und Isolierung von GSH-Peroxidase	2
1.1.2.	Charakteristik des Enzymmoleküls	4
1.1.3.	Reaktionsverhalten von Glutathionperoxidase	5
1.1.3.1.	Verhalten gegenüber seinen Substraten	5
1.1.3.2.	Aktivitätstest und Enzymkinetik	7
1.1.3.3.	Effektoren der Enzymaktivität	10
1.1.4.	Biologische Funktion von Glutathionperoxidase	11
1.2.	ZUR BIOCHEMIE VON SELEN	17
1.2.1.	Die toxische Wirkung von Selen	17
1.2.2.	Selen als essentielles Spurenelement	18
1.2.3.	Zum Stoffwechsel von Selenverbindungen	20
1.2.3.1.	Stoffwechsel von anorganischem Selen	21
1.2.3.1.1.	Der Selenotrisulfid-Weg	21
1.2.3.1.2.	Diskussion alternativer Selenit-Transformationen und Selen-Bindungen	26
1.2.3.2.	Vorkommen und Stoffwechsel von Selenoaminosäuren	29
1.2.4.	Zur biologischen Funktion von Selen	31
1.2.4.1.	Rolle von Selen im zellulären Energiestoffwechsel	32
1.2.4.1.1.	Selenabhängige Decarboxylierungsreaktionen	32
1.2.4.1.2.	Einfluß von Selen auf Ubichinon	33
1.2.4.1.3.	Selenhaltiges Cytochrom	33
1.2.4.1.4.	Mikrobielle, selenhaltige Redoxsysteme	34
1.2.4.1.5.	Selen in Nicht-Häm-Eisen-Proteinen und im Diplock-Lucy-Modell	37
1.2.4.2.	Funktionen von Selen im zellulären Oxidationsschutz	39
1.2.4.2.1.	Selenverbindungen als Antioxidanzien	39
1.2.4.2.2.	Beziehungen zwischen Selen und Schwermetallen	40
1.2.4.2.3.	Einfluß von Selen auf die Karzinogenese	41
1.2.4.2.4.	Wirkung von Selen auf Lysosomen	42

Seite

1.2.4.2.5. Einwände gegen Selen als "klassisches Antioxidanz" 42
1.2.4.2.6. Selen als Effektor von SH-Enzymen 43
1.2.4.2.7. Selen als Enzymbestandteil in Glutathionperoxidase 45
1.3. ZIELE DER VORLIEGENDEN ARBEIT 48

2. MATERIAL UND METHODEN 50
2.1. VERWENDETE GERÄTE 50
2.2. VERWENDETE SUBSTANZEN 50
2.3. METHODEN 52
2.3.1. Zur Isolierung und Kristallisation von GSH-Peroxidase aus Rinderblut 52
2.3.2. Proteinbestimmungen 55
2.3.3. Standard-Aktivitätstest und Berechnung der enzymatischen Einheiten von Glutathionperoxidase 55
2.3.4. Überprüfung der Aktivierbarkeit von GSH-Peroxidase 57
2.3.5. Ansatz zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit des enzymatischen Umsatzes 57
2.3.6. Test der Umsatzraten bei pH 7,7 unter variierten H_2O_2-Konzentrationen 58
2.3.7. Kontinuierlicher Aktivitätstest in einer kinetischen Studie mit verschiedenen Hydroperoxid-Substraten 59
2.3.8. Hydroperoxidbestimmung 59
2.3.9. Ansätze zur modifizierenden Hemmung von GSH-Peroxidase 60
2.3.9.1. Allgemeine Angaben zur Durchführung der Modifizierungen 60
2.3.9.2. Diazotierung von 5-Amino-1H-tetrazol 61
2.3.9.3. Photooxidation mit Hilfe von Bengalrosa 61
2.3.9.4. Modifizierungsansätze mit Tetranitromethan 62
2.3.9.5. Isolierung des Produkts aus Jodacetat und GSH 62
2.3.9.6. Zu den Modifizierungsansätzen mit Jodacetat 62

Seite

2.3.9.7. Ansatz zur Titration GSH-vorbehandelter Glutathionperoxidase mit t-Butylhydroperoxid 63
2.3.10. Zur Hydrolyse und Aminosäurebestimmung von GSH-Peroxidase 64
2.3.10.1. Hydrolysen mit p-Toluolsulfonsäure und mit HCl 64
2.3.10.2. Aminosäureanalyse 65
2.3.11. Zur Oxidation von GSH-Peroxidase mit Perameisensäure 66
2.3.12. Photometrische Bestimmung des Tyrosin/Tryptophan-Verhältnisses in GSH-Peroxidase 66
2.3.13. Zur Selenbestimmung durch Neutronenaktivierungsanalyse 67

3. E R G E B N I S S E 68
3.1. KRISTALLISIERTE GLUTATHIONPEROXIDASE 68
3.2. EICHUNG DER PROTEINBESTIMMUNG NACH LOWRY ET AL.[141] MIT HOCHGEREINIGTER GSH-PEROXIDASE 69
3.3. ÜBERPRÜFUNG DER AKTIVIERBARKEIT VON GLUTATHIONPEROXIDASE 70
3.4. ENZYMKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN MIT VERSCHIEDENEN HYDROPEROXIDEN 71
3.5. ZUR PH-ABHÄNGIGKEIT DER GLUTATHIONPEROXIDASE-AKTIVITÄT 74
3.6. HEMMUNG VON GSH-PEROXIDASE DURCH GRUPPENSPEZIFISCHE REAGENZIEN 78
3.6.1. Überprüfung der Wirkung verschiedener Modifizierungsreagenzien an Glutathionperoxidase mit und ohne GSH-Vorinkubation 79
3.6.2. Versuche zur Spezifität einiger Modifizierungsreaktionen 86
3.6.2.1. pH-Abhängigkeit der Hemmwirkung von Tetranitromethan 86
3.6.2.2. pH-Abhängigkeit und Donorsubstrat-Spezifität der photooxidativen Hemmung von GSH-Peroxidase 89
3.6.2.3. pH-Abhängigkeit der Jodacetat-Hemmung 92

Seite

3.6.3. Titration der redoxaktiven Zentren von Glutathionperoxidase mit Hilfe der Jodacetat-Hemmung 94

3.7. UNTERSUCHUNGEN ZUM AMINOSÄUREGEHALT VON GSH-PEROXIDASE 99

3.7.1. Analyse nach Hydrolyse mit p-Toluolsulfonsäure 99

3.7.2. Analyse nach Perameisensäure-Oxidation von Glutathionperoxidase 100

3.7.3. Photometrische Bestimmung des Tyrosin/Tryptophan-Quotienten nach Bencze und Schmid[13] 102

3.8. SELENGEHALT VON GLUTATHIONPEROXIDASE AUS RINDERERYTHROCYTEN 104

3.8.1. Quantitative Bestimmung von Selen im hochgereinigten Enzym 104

3.8.2. Selenvorkommen im p-Toluolsulfonsäure-Hydrolysat von GSH-Peroxidase 107

4. D I S K U S S I O N 113

4.1. KINETISCHER MECHANISMUS VON GLUTATHION-PEROXIDASE 113

4.1.1. Reaktion von Peroxidase mit Akzeptorsubstrat 116

4.1.2. Reaktion von GSH-Peroxidase mit Donorsubstrat 117

4.2. KATALYTISCHE VORGÄNGE AM GLUTATHION-PEROXIDASE-MOLEKÜL 118

4.2.1. Hinweise auf essentielle Gruppen für die Enzymaktivität 119

4.2.2. Vorstellungen zum reaktiven Zentrum von GSH-Peroxidase 123

4.3. BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DEM SELENGEHALT UND DER GLUTATHIONPEROXIDASE-AKTIVITÄT IN BIOLOGISCHEM MATERIAL 130

5. Z U S A M M E N F A S S U N G 132

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S 135

EINLEITUNG

1957 berichtete Mills[165] über einen hitzelabilen, makromolekularen Faktor aus Rindererythrocyten, der bei Anwesenheit von GSH den oxidativen Zerfall von Hämoglobin durch H_2O_2 verhinderte. Das Enzym katalysierte die Reaktion:

$$H_2O_2 + 2\ GSH \longrightarrow 2\ H_2O + GSSG$$

und wurde damit als Glutathionperoxidase, Glutathion: H_2O_2-Oxidoreduktase (EC 1.11.1.9.), eingestuft. Unabhängig davon führte die Fähigkeit dieses Enzyms, die GSH-induzierte Schwellung von Lebermitochondrien zu verhindern, zur "zweiten Entdeckung" von Glutathionperoxidase. Die beschriebene "C-Faktor-Aktivität" wurde von Neubert, Wojtczak und Lehninger[172] überwiegend Glutathionperoxidase zugeordnet. Little und O'Brien[135] identifizierten schließlich das Enzym, das in Rattenleber-Cytoplasma GSH-abhängig Linolsäurehydroperoxid zu reduzieren vermochte ebenfalls als Glutathionperoxidase.

1957, im Jahr der Erstbeschreibung von GSH-Peroxidase, stellten Schwarz und Foltz[208] - zunächst am knoblauchähnlichen Geruch - fest, daß der von ihnen aus amerikanischer Brauhefe angereicherte Leberschutzfaktor Selen enthielt. Die Autoren definierten Selen als essentielles Spurenelement, eine These, die inzwischen vielfach bestätigt wurde[12, 13, 253, 157, 276].

Seither wurde einerseits Glutathionperoxidase als wichtiger Bestandteil des intrazellulären Oxidationsschutz-Systems der Tiere charakterisiert. Die Entdeckung von Schwarz und Foltz stand andererseits am Beginn einer weitgespannten Suche nach der biologisch wirksamen Form von Selen. Selbst als sich abzeichnete, daß die biologische Wirkung von Selen ähnliche Zellvorgänge betraf, und Caldwell und Tappel[26] die Reaktion von Glutathionperoxidase sogar als ein Beispiel ihrer Hypothese zur antioxidativen Funktion von Selen zitierten, war noch kein direkter Zusammenhang zwischen dem Spurenelement und dem Enzymmolekül hergestellt. Zwar mußte Glutathionperoxidase angesichts ihrer ungewöhnlichen Eigenschaften eine Sonderstellung unter den Peroxidasen eingeräumt werden. In der Enzymologie fehlten jedoch Hinweise und Beispiele, die für eine Anwesenheit von Selen in Glutathionperoxidase gesprochen hätten. So blieb es

Rotruck und Mitarbeitern[198] vorbehalten, die Verschmelzung beider Forschungszweige einzuleiten, indem sie von der glucoseabhängigen Schutzwirkung von Selen in Rattenerythrocyten auf den Selengehalt von Glutathionperoxidase schlossen. Ihre Untersuchungen weckten den Verdacht, daß in GSH-Peroxidase nicht nur das erste Selenoenzym entdeckt, sondern auch ein erster konkreter Anhaltspunkt für die mechanistischen Grundlagen der biologischen Funktion von Selen gefunden wurde.

Diese neue Entwicklung mußte sich auch auf die Problemstellung der vorliegenden Arbeit auswirken. Durch Untersuchungen an hochgereinigter Glutathionperoxidase aus Rindererythrocyten wurde versucht, die Reaktionsweise dieses Enzyms näher zu umreißen und Glutathionperoxidase als Selenoenzym zu charakterisieren. Für den Reaktionsmechanismus und für die biologische Bewertung von Glutathionperoxidase ergeben sich durch die jüngsten Untersuchungen neue Aspekte, die im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit diskutiert werden sollen, Zunächst seien die beiden Stoffgebiete, die Eigenschaften von Glutathionperoxidase und die betroffenen Zusammenhänge der Biochemie von Selen, vorgestellt.

1.1. Eigenschaften von Glutathionperoxidase

1.1.1. Vorkommen und Isolierung von GSH-Peroxidase

Glutathionperoxidase wurde in Geweben verschiedener Tierarten nachgewiesen[165, 167, 182] und scheint im Tierreich verbreitet zu sein. Auch in höheren Pflanzen[71] und in bestimmten Mikroorganismen[93] existieren GSH-abhängige Peroxidstoffwechselwege. Die Abgrenzung der Bezeichnung Glutathionperoxidase wurde deshalb nach den charakteristischen Eigenschaften der Enzyme aus Tiergeweben getroffen. Die Aktivitäten aus Spinatblättern[71] und aus einer Art von Candida lipolytica[94] weichen zum Beispiel durch ihre pH-Abhängigkeit von tierischer Glutathionperoxidase ab. Das mikrobielle Enzym entsprach jedoch in seinem Verhalten gegenüber seinen Substraten und bestimmten Inhibitoren so deutlich den Enzymen aus Tiergeweben, daß es in die Definition einer Glutathionperoxidase einbezogen wurde[94].

Wie erwähnt, wurde GSH-Peroxidase in Erythrocyten und Leber unabhängig voneinander entdeckt. Inzwischen scheint gesichert, daß beide Enzyme der Ratte zumindest funktionell identisch sind[63]. An der Ratte wurde die Organverteilung von Glutationperoxidase eingehender untersucht[167, 161]. Übereinstimmend fanden sich die höchsten Enzymkonzentrationen in der Leber. Niedrigere spezifische Aktivitäten enthielten in fallender Reihenfolge: Niere, Blut, Magen, Milz, Herz und Lunge[161]. Minimale Enzymaktivitäten wurde in Nebenniere, Gehirn, Skelettmuskulatur, Hoden und im Intestinaltrakt[167]gefunden. Bemerkenswert erscheint das Vorkommen von Glutathionperoxidase in der Augenlinse[109], das an verschiedenen Tierarten gesichert wurde[188].

In der Leberzelle findet sich die Glutathionperoxidase zum größten Teil im Cytoplasma[70]. Es schien zunächst, als ob ein "kryptischer" Anteil des Enzyms an die Mitochondrienmembran gebunden sei[172]. Durch effektivere Fraktionierungsverfahren konnte diese Enzymfraktion jedoch im Matrixraum der Mitochondrien lokalisiert werden[70, 91]. Den anderen Kompartimenten der Leberzelle wurden nur unbedeutende Glutathionperoxidase-Aktivitäten zugeordnet[70]. Damit unterscheidet sich die subzelluläre Verteilung von GSH-Peroxidase in der Rattenleber deutlich von der Kompartimentierung von Katalase, die sich überwiegend auf die Peroxisomen beschränkt[70].

Eingehendere Untersuchungen der enzymatischen und molekularen Eigenschaften eines Enzyms erfordern gewöhnlich dessen Anreicherung oder Isolierung. Glutathionperoxidase wurde von Mills aus Rindererythrocyten angereichert[166]. Das Präparat erwies sich jedoch als instabil. Aus dem gleichen Material gewannen Schneider und Flohé Glutathionperoxidase mit hoher spezifischer Aktivität[204]. Flohé et al.[67]beschrieben später die Reindarstellung des Enzyms in wägbarer Menge. Die verwendete Präparationsmethode hat sich inzwischen mehrfach bewährt[96]und wurde, leicht modifiziert, auch im Rahmen dieser Arbeit angewandt (vgl. 2.2.1.).

Glutathionperoxidase wurde auch aus anderen Geweben angereichert. Little und O'Brien[135]präparierten das Enzym aus Rattenleber, Holmberg[109]aus Rinderaugenlinse, Flohé et al.[63] aus Erythrocyten und Leber der Ratte, Little et al.[137]aus Schweineerythrocyten, und Rotruck et al.[199]aus Erythrocyten von Ratte und Schaf.

1.1.2. Charakteristik des Enzymmoleküls

Angesichts der aufwendigen Trennverfahren und geringen Ausbeuten bei der Isolierung von Glutathionperoxidase erscheint es verständlich, daß erst wenige Angaben über den Aufbau des Enzymmoleküls vorliegen. Die Molekulargewichtsangaben für Glutathionperoxidasen bewegen sich zwischen 80 000 und 100 000. Durch Gelchromatographie wurden die Enzyme aus Erythrocyten[204] und Augenlinse[109] des Rindes mit 85 000 beziehungsweise mit 95 000 veranschlagt. Rotruck et al.[199] geben für das Enzym aus Rattenerythrocyten einen Wert von 90 000 an. Paglia und Valentine[182] schätzten das Molekulargewicht des Enzyms aus Humanblut auf 100 000. Exaktere Angaben stammen von Flohé et al.[67], die mit der Sedimentationsgleichgewichts-Methode das Molekulargewicht hochgereinigter GSH-Peroxidase aus Rindererythrocyten auf 83 800 ± 1 200 eingrenzten.

Am gleichen Material wurde festgestellt[67], daß Glutathionperoxidase, mit Natriumdodecylsulfat behandelt, in Untereinheiten dissoziiert. Diese wanderten in der Natriumdodecylsulfat-Elektrophorese gleichförmig. Das so ermittelte gemeinsame Molekulargewicht von etwa 21 000 spricht deshalb dafür, daß Glutathionperoxidase aus 4 Teilproteinen etwa gleicher Molekülgröße besteht[67]. Bemerkenswerterweise fanden Rotruck et al.[199] bei der Gelchromatographie angereicherter, ^{75}Se-markierter Glutathionperoxidase aus Rattenblut einen zweiten Radioaktivitäts-Peak ohne Enzymaktivität entsprechend einem Molekulargewicht um 25 000.

Unterschiede im Molekülaufbau der Glutathionperoxidasen aus Rind und Ratte sind vermutlich für die Differenz der isoelektrischen Punkte verantwortlich. Der Wert für das Enzym aus Rattenerythrocyten geht mit fallender Ionenstärke gegen 7[63], während er unter entsprechenden Bedingungen für das Rinderenzym bei 6 liegt[62].

Die Sonderstellung von Glutathionperoxidase wird eindrucksvoll durch die spektralen Eigenschaften des Enzymmoleküls unterstrichen[69]. Im Gegensatz zu allen bisher bekannten Peroxidasen zeigte das Absorptionsspektrum des hochgereinigten Enzyms aus Rinderblut, außer der Absorption normaler Proteinbestandteile

um 28o nm, keine erkennbaren Banden im längerwelligen Bereich. Entsprechend verzeichnete die optische Rotationsdispersion bei diesen Wellenlängen keine weiteren Cotton-Effekte.

CD-Spektren im kurzwelligen UV-Bereich deuteten auf einen relativ geringen α-Helix-Gehalt des nativen Enzymmoleküls[69].

Auf die Anwesenheit von GSH reagiert Glutathionperoxidase mit deutlichen spektralen Veränderungen, die sich in erhöhter Absorption beziehungsweise in einer schärferen Strukturierung des CD-Spektrums im UV-Bereich äußern. Dieser Effekt wurde als tiefgreifende Konformationsänderung am Enzymmolekül gedeutet[69].

1.1.3. Reaktionsverhalten von Glutathionperoxidase

1.1.3.1. Verhalten gegenüber verschiedenen Substraten

Eine weitere charakteristische Eigenschaft von Glutathionperoxidase ist ihre Substratspezifität. Sie ist gekennzeichnet durch geringe Selektivität hinsichtlich des Akzeptorhydroperoxids und durch sehr hohe Spezifität gegenüber dem Donorsubstrat GSH. Dieses Verhalten ist konträr dem anderer Peroxidasen, die, wie zum Beispiel Meerrettich-Peroxidase, verhältnismäßig wahllos aromatische Amine oder Phenole oxidieren, im Akzeptor hingegen auf H_2O_2 und wenige aliphatische Hydroperoxide beschränkt sind[263].

Glutathionperoxidase setzt die erwähnten Peroxidase-Donorsubstrate nicht um[166]. Wegen der verhältnismäßig geringen Umsatzraten wurde die Donor-Funktion unphysiologischer Thiole erst gesichert, als genügend angereichertes Enzym zur Verfügung stand[135]. Eine umfangreiche Untersuchung von Flohé und Mitarbeitern[68] versuchte, von dem enzymatischen Umsatz verschiedener Thiole auf die Beziehungen zwischen Enzymmolekül und Donorsubstrat zu schließen. Die Umsatzraten wurden unter Akzeptor-Sättigung gemessen. Bei der Bewertung der Umsatzgeschwindigkeiten wurden die unterschiedlichen pK_{SH}-Werte und die spontanen Umsatzraten der Thiole mit H_2O_2 berücksichtigt.

Zunächst bestätigte sich GSH als spezifisches Donorsubstrat von Glutathionperoxidase, das in seinem Umsatz von keinem der untersuchten Thiole erreicht wurde. Die Differenz zwischen

seiner unspezifischen und enzymatischen Reaktivität erklärt sich nur, wenn eine spezielle Wechselwirkung zwischen GSH und Glutathionperoxidase angenommen wird. Eine strukturelle Verwandschaft zu Glutathion wirkte sich besonders bei den Modellpeptiden auf die Umsatzgeschwindigkeit aus, die den γ-Glutamylrest enthielten. N-Acetylcysteinylmethylester wurde wesentlich langsamer umgesetzt, als das entsprechende γ-Glutamylpeptid. N-Acetylcysteinylglycin zeigte dagegen nur noch 2,7% der Aktivität von GSH. Der γ-Glutamylrest scheint damit wesentlich an der Beziehung zwischen Glutathionperoxidase und seinem Donorsubstrat beteiligt zu sein. Aus dem Vergleich der Umsatzraten von freien Aminothiolen wie Cystein oder Cysteamin mit ihrem N-Acetyl-Derivaten scheint hervorzugehen, daß eine positiv geladene Ammoniumgruppierung in der Nähe des Donor-Sulfhydryls die enzymatische Umsatzgeschwindigkeit drosselt. Eine Erklärung dafür mag in den Ladungsverhältnissen im reaktiven Bereich des Enzyms oder in den strukturellen Besonderheiten der Aminothiole[74] zu suchen sein. Im Gegensatz zu diesen mehr spezifischen Substraten schienen die enzymatischen wie die spontanen Umsatzraten der unspezifischen Donor-Substrate von den Dissoziationskonstanten ihrer SH-Gruppen abzuhängen.

Als Little und O'Brien fanden[135], daß Fettsäure-Hydroperoxide wie H_2O_2 von Glutathionperoxidase umgesetzt werden konnten, wirkte sich diese Entdeckung besonders auf die Überlegungen zur biologischen Funktion des Enzyms aus. Christophersen[33,34] identifizierte die Reaktionsprodukte der enzymatischen Reduktion peroxidierter, ungesättigter Fettsäuren als deren Hydroxysäure-Derivate. Die von Glutathionperoxidase katalysierte Reaktion konnte damit verallgemeinert werden:

$$R\text{-}O\text{-}OH + 2\ GSH \longrightarrow R\text{-}OH + H_2O + GSSG.$$

Inzwischen wurde eine Reihe von Hydroperoxiden verschiedenster Struktur als Akzeptorsubstrate von Glutathionperoxidase eingesetzt. Außer Cumol- und t-Butyl-Hydroperoxid[135] und den Hydroperoxiden von Linol- und Linolensäure[135] wurden selbst Thyminhydroperoxid und peroxidierte DNS als Akzeptorsubstrate überprüft[35]. Unter den kürzlich getesteten Steroidhydroperoxiden[138] fand sich das bisher einzige nicht umsetzbare Hydroperoxid, Cholesterol-25-hydroperoxid, und ein Hydroperoxid mit außerge-

wöhnlich starker inaktivierender Wirkung, 6-Ketocholestanol-5-hydroperoxid.

1.1.3.2. Aktivitätstest und Enzymkinetik

Die Enzymkinetik untersucht die Beziehungen zwischen Substraten und Enzymmolekül auf Grund der Umsatzraten unter variierten Substrat-Enzym-Relationen. Erste Untersuchungen von Glutathionperoxidase in dieser Richtung ergaben, daß sich ihr enzymatischer Umsatz mit steigenden GSH-Konzentrationen kontinuierlich erhöhte[61, 40]. In verschiedenen Fällen konnte für Glutathionperoxidase kein K_m-Wert für GSH gefunden werden[64, 63, 109]. Die Reduktion von H_2O_2 verlief hingegen so rasch, daß große meßtechnische Schwierigkeiten auftraten, wenn dieses Substrat limitierend eingesetzt werden sollte[61].

An dieser Stelle sei kurz auf die Methoden der Aktivitätsbestimmung von Glutathionperoxidase eingegangen. Zwei Testverfahren stehen dafür zur Verfügung:

1. Ein "fixed-time-assay", bei dem der Umsatz an Substrat, Thiol oder Hydroperoxid, während einer bestimmten Inkubationszeit nach Unterbrechen der Enzymreaktion analysiert wird[72].
2. Ein gekoppelter Test, bei dem GSSG-Reduktase das durch GSH-Peroxidase oxidierte Glutathion durch NADPH kontinuierlich zurückreduziert[182]. Die Reaktion kann damit photometrisch verfolgt werden.

Die Abhängigkeit des enzymatischen Umsatzes von GSH bewirkt, daß die Reaktion im erstgenannten Testsystem zumindest pseudo erster Ordnung verläuft, ihre Geschwindigkeit also stets von der aktuellen GSH-Konzentration abhängt[204]. Auf diese Verhältnisse stimmten Schneider und Flohé[204] die Definition der Glutathionperoxidase-Einheiten ab und setzten sie als Differenz der Logarithmen aus den GSH-Konzentrationen nach einer Minute Inkubationsdauer fest:

$$\lg [GSH]_0 / [GSH]_1 .$$

Kompliziert werden die Verhältnisse durch die nichtenzymatische Oxidation von GSH durch Hydroperoxide. Diese Reaktion verläuft ebenfalls höherer Ordnung und konkurriert daher mit der enzymatischen Reaktion. Die spontane GSH-Oxidation wird

überdies von einigen Zellkomponenten, zum Beispiel Hämoproteinen, unspezifisch beschleunigt[64, 98]. Wenn exakte Bestimmungen durchgeführt werden sollen, müssen deshalb normalerweise hohe Konzentrationen gereinigter Glutathionperoxidase bei kurzen Reaktionszeiten eingesetzt werden.

Beim gekoppelten Testverfahren[182, 64] kann durch enzymatische Regeneration die GSH-Konzentration konstant gehalten werden. Dadurch wird eine Reaktion pseudo nullter Ordnung erzielt, bei der die Umsatzraten der Nebenreaktionen subtrahiert werden können. Die Anfälligkeit dieser Testmethode liegt jedoch in der Indikatorreaktion begründet[64]. Um die Umsatzrate vor Glutathionperoxidase stets limitierend zu halten, muß GSSG-Reduktase in vergleichsweise hohen Aktivitäten eingesetzt werden. Dabei muß berücksichtigt werden, daß Glutathionreduktase in gewissem Umfang der Produkthemmung durch GSH und der Substrathemmung durch NADPH unterliegt.

Die besonderen methodischen Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Akzeptorsubstrat-Abhängigkeit von Glutathionperoxidase liegen im Verhalten des Enzyms selbst. Die schnelle Reaktion von Wasserstoffperoxid bewirkt, daß seine Konzentration erst dann den Reaktionsablauf beeinflußt, wenn sie um Größenordnungen tiefer liegt als die des Donorsubstrats GSH. Das bedeutet, daß unter Inkubationsbedingungen gemessen werden muß, bei denen hohe Spontanumsätze das limitierende Substrat und die gemessene Umsatzrate beeinflussen können. Außerdem bedarf es eines prozentual hohen Umsatzes an Akzeptorsubstrat, um eine Differenz der Donorsubstratkonzentration meßtechnisch zu erfassen. Ein hoher Substratumsatz läßt sich aber gewöhnlich nicht mit der Forderung der Kinetik vereinbaren, Initialgeschwindigkeiten auszuwerten.

Flohé und Mitarbeiter[73] begegneten diesen Problemen, indem sie hohe Konzentrationen hochgereinigter Rindererythrocyten-Glutathionperoxidase verwendeten und mit Hilfe eines "Quenching-Type-Rapid-Flow"-Apparates[140] sehr kurz, zwischen 0,3 und 1,1 Sekunden, inkubierten. In dem durch Säure abgestoppten Reaktionsgemisch wurde das limitierende Substrat, Wasserstoffperoxid, analysiert. Die gemessenen Umsatzgeschwindigkeiten wurden den mittleren Akzeptorsubstrat-Konzentrationen zugeordnet, um Differenzen der Umsatzrate durch erhöhten Substratverbrauch zu korrigieren[132].

Die Untersuchungen ergaben im doppelt reziproken Diagramm nach Dalziel[42] für verschiedene GSH-Konzentrationen parallele Akzeptorabhängigkeits-Geraden. Die scheinbare Maximalgeschwindigkeit und der K_m für H_2O_2 strebten mit steigender GSH-Konzentration gegen unendlich. Damit bestätigten sich die früheren Befunde, die an diesem Enzym für GSH keinen K_M-Wert definieren konnten. die Ergebnisse stehen im Einklang mit einem "Ping-Pong-Mechanismus"[38], bei dem ein Substrat zunächst das Enzym selbst modifiziert, ohne daß das zweite Substrat diese Reaktion beeinflussen kann. Die Proportinalität der scheinbaren Maximalgeschwindigkeiten mit der GSH-Konzentration deutet darauf hin, daß Glutathionperoxidase aus Rinderblut einer Sonderform dieses Reaktionstyps gehorcht, die nach Dalziel[42, 43] folgendermaßen beschrieben werden kann:

$$\frac{[E_o]}{\bar{v}} = \frac{\emptyset_1}{[\bar{A}]} + \frac{\emptyset_2'}{[\bar{B}]} \quad \text{(vgl. 4.1.).}$$

Dabei entspricht $[E_o]$ der Enzymkonzentration, v der Initialgeschwindigkeit, $[A]$ der Akzeptor- und $[B]$ der Donorsubstratkonzentration. Vorbehaltlich der Richtigkeit des angenommenen Reaktionsmodells können $\emptyset_1$ und $\emptyset_2'$ graphisch bestimmt werden und stellen reziproke Geschwindigkeitskonstanten dar. Während $\emptyset_2$ eine komplexere Funktion der mehrstufigen Enzymreduktion durch GSH beinhaltet, geht aus $\emptyset_1$ unmittelbar die Geschwindigkeitskonstante der Enzymoxidation durch Wasserstoffperoxid hervor. Der ermittelte Wert für die Geschwindigkeitskonstante K_{+1} lag unter den gewählten Bedingungen mit mehr als 10^7/ M x sec in einem sehr hohen Bereich[73].

Little und Mitarbeiter[137] untersuchten die Kinetik von Glutathionperoxidase an dem Enzym aus Schweineerythrocyten. Die erwähnten methodischen Schwierigkeiten umgingen die Autoren, indem sie Cumolhydroperoxid als Substrat verwendeten. Dieser Akzeptor unterscheidet sich dadurch von H_2O_2, daß er keine so extreme Substrat-Relationen erfordert, um limitierend zu werden. Die Umsatzraten von Glutathionperoxidase konnten deshalb im gekoppelten Testsystem bestimmt werden.

Die Untersuchungen ergaben zunächst einen limitierenden K_M-Wert für GSH von 3 mM. Die weiteren Ergebnisse sind deshalb

schwer zu deuten, weil die Substratabhängigkeiten des enzymatischen Umsatzes im doppelt reziproken Diagramm abgeknickt beziehungsweise uneinheitlich verlaufen. Es wurde deshalb vermutet, daß sich der Reaktionsmechanismus oder das Enzymmolekül abhängig von der Akzeptorkonzentration verändert. Das beobachtete Reaktionsverhalten ließ sich deshalb nicht auf einen einheitlichen Enzymmechanismus festlegen.

1.1.3.3. Effektoren der Enzymaktivität

Der gezielte Einsatz von Inhibitoren oder Effektoren der enzymatischen Reaktion kann weitere Informationen über den Substratbindungsmechanismus oder die reaktive Gruppierung eines Enzyms liefern. Als entscheidendes Kriterium einer Glutathionperoxidase und zugleich als Beweis für die Abwesenheit funktionellen Porphyrins gilt, daß das Enzym nicht durch Cyanid, Azid oder Fluorid hemmbar ist[165, 135, 204, 94]. Andererseits wurde die Beteiligung von Flavin an der Funktion von Glutathionperoxidase u.a. dadurch ausgeschlossen, daß dieses Enzym weder durch Flavin-Coenzyme noch durch das Flavinanaloge Chinacrin zu beeinflussen war[60, 135].

Gruppenspezifische Inhibitoren unterschieden sich bemerkenswert in ihrem Einfluß auf die Aktivität von Glutathionperoxidase. Niedrige Konzentrationen von Schwermetallen und SH-Reagenzien hemmten das Rinderenzym nicht signifikant[204]. Jodacetat, Jodacetamid, Arsenit und Cu^{++} zeigten keinen Effekt auf die Aktivität des Enzyms[135], während pCMB und NEM Glutathionperoxidase hemmten[135, 137]. Hg^{++}-Ionen bewirkten in Verbindung mit EDTA eine starke Hemmung[204]. Ohne diesen Komplexliganden blieben sie jedoch unwirksam, oder hemmten wie Sulfitionen das reduzierte Enzym nur reversibel[204].

Von Little und Mitarbeitern[137, 136] wurde berichtet, daß Glutathionperoxidase von Nukleotiden, besonders von Coenzym A, ATP und NADP, gehemmt wird. Verschiedenartige Schädigungen des Enzyms betrafen die enzymatische Aktivität und den Einfluß von ATP in unterschiedlichem Ausmaß. Daraus wurde geschlossen, daß die Beeinflussung durch Nukleotide nicht unmittelbar an der aktiven Gruppierung des Enzyms angreift[137]. ATP scheint vielmehr mit GSH um die Bindung am Enzym zu konkurrieren. CoA-SH

wirkt offenbar auf ähnliche Weise wie ATP[136]. Zwei Strukturen dieser Inhibitoren sind möglicherweise für deren Wirkung maßgebend: der Nukleotidanteil und die Anzahl von Phosphatreste. In diesem Zusammenhang sei auch darauf hingewiesen, daß Glutathionperoxidase durch multivalente Pufferanionen gehemmt wird.

Glutathionperoxidase aus Rinderblut wurde durch die GSH-analoge Ophthalmsäure nicht gehemmt[68]. Außerdem ergab die Gleichgewichtschromatograhie mit radioaktiv markiertem GSH keinen Anhaltspunkt dafür, daß das Donorsubstrat an das Enzym gebunden wurde[68]. Dieser Befund steht nur scheinbar im Widerspruch zu der beobachteten Hemmung durch Thiole und der hohen Donor-Substratspezifität des Enzyms. Er wird unter der Annahme erklärbar, daß unter den Inkubationsbedingungen der Bindungsstudie Glutathionperoxidase in der reduzierten Form vorlag. Nach den kinetischen Ergebnissen von Flohé et al.[73] soll aber diese Enzymform nicht vom Donorsubstrat beeinflußt werden (vgl. 4.1.).

Little und Mitarbeiter[137] fanden, daß sich die Aktivität hochangereicherter Glutathionperoxidase aus Schweineblut durch Inkubation mit GSH um das Dreifache steigern ließ. An Glutathionperoxidase aus Rindererythrocyten konnte die Aktivierbarkeit bestätigt werden[96]. Die Möglichkeit und das Ausmaß der beobachteten Aktivitätssteigerung hingen stark vom Zustand der Enzymprobe, vom pH-Wert und von der GSH-Konzentration des Inkubationsansatzes ab[96].

1.1.4. Biologische Funktion von Glutathionperoxidase[66]

Auf Grund der von ihr katalysierten Reaktion hat Glutathionperoxidase offenbar die Aufgabe, H_2O_2 und andere Hydroperoxide in der Zelle zu beseitigen. Die Bewertung dieser Funktion kann nach verschiedenen Kriterien erfolgen:

1. Nach dem Vorkommen von Glutathionperoxidase und ihrer Relation zu Katalase als zweitem Abbaumechanismus für H_2O_2;

2. nach der Besonderheit ihrer Akzeptorsubstrat-Spezifität und

3. nach der Beeinflußbarkeit der enzymatischen Reaktion durch Substrate, Inhibitoren oder übergeordnete Zellvorgänge.

H_2O_2 kann in der Zelle entweder endogen entstehen, zum Beispiel als Produkt von Oxidasen, oder durch äußere Einwirkungen wie strahlungsinitiierte Radikalketten. Zur Bewertung von Enzymdefekten wie zum Beispiel Akatalasie stellte sich die Frage, ob H_2O_2 im Gewebe über Katalase oder über Glutathionperoxidase eliminiert wird. Inzwischen scheint festzustehen, daß Glutathionperoxidase bei den normalen GSH-Konzentrationen der Zelle H_2O_2 mit vergleichbarer Geschwindigkeit umsetzen kann wie Katalase. Welcher Eliminierungsmechanismus in vivo dominiert, scheint damit hauptsächlich vom Mengenverhältnis der konkurrierenden Enzyme abzuhängen. In Humanerythrocyten dürfte deshalb normalerweise der Abbau von H_2O_2 bevorzugt über Katalase verlaufen. In der Augenlinse scheint dagegen kaum Katalase vorhanden zu sein. Auch in Lebermitochondrien ist GSH-Peroxidase offenbar ohne Konkurrenz[70]. In der Leberzelle dürfte die unterschiedliche Kompartimentierung von Glutathionperoxidase und Katalase die Effektivität der H_2O_2-Abbauwege bestimmen[238].

Da in Erythrocyten Glutathionperoxidase Katalase weitgehend ersetzen kann[1], Katalase hingegen nicht die Wirkung von GSH-Peroxidase erzielte[66], müssen sich die biologischen Funktionen der beiden Enzyme unterscheiden. In letzter Zeit stellt sich zunehmend die Frage, ob H_2O_2 tatsächlich als Ursache von oxidativen Zellschäden angesehen werden kann[10, 280]. Glutathionperoxidase unterscheidet sich von Katalase durch ihre Fähigkeit, sehr unspezifisch Hydroperoxide abzubauen. Ungesättigte Fettsäuren in Membranlipiden unterliegen anscheinend bevorzugt dem Angriff von Sauerstoffradikalen. Dadurch kann es zur Bildung von Hydroperoxiden kommen, die zu Lipidperoxiden vernetzt, Membranschäden mit tiefgreifenden Folgen nach sich ziehen können. Als Indikator dieser Vorgänge gilt das Auftreten von konjugiert ungesättigten Fettsäuren, von Malondialdehyd, vernetzten Fettsäure-Peroxiden und möglicherweise die Bildung von Lipofuszin. Die genannten Vorgänge können offenbar zumindest partiell von Glutathionperoxidase verhindert werden[77]. So konnte die Schwellungsneigung und die Lipidperoxidbildung in Mitochondrien mit deren Gehalt an Glutathionperoxidase korreliert werden[65]. Dieses Enzym scheint damit für die Integrität von Membranen mitverantwortlich zu sein. Die Rolle von

Glutathionperoxidase in diesem Zusammenhang ist in Abbildung 1 nach Zimmermann[280] dargestellt.

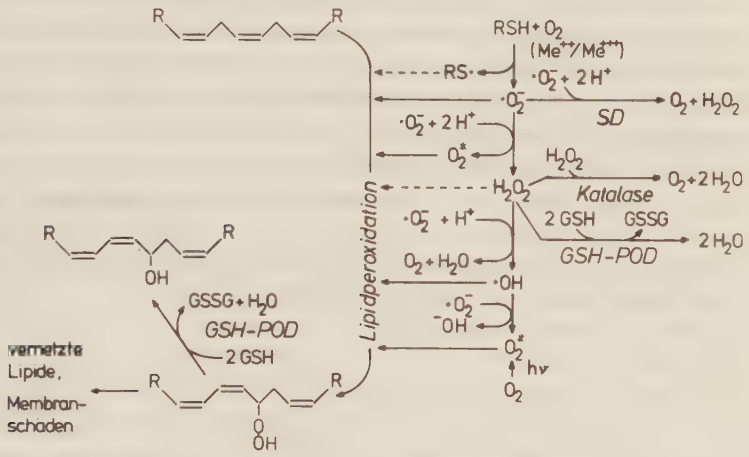


Abb. 1: Zur Stellung von GSH-Peroxidase (GSH-POD) im zellulären Membranschutz (nach l.c.[280])

Die Metallionen-katalysierte Thioloxidation und Bestrahlung ($h\nu$) werden als Beispiele der Schäden auslösenden Vorgänge betrachtet. Als reaktive Schadstoffe werden primär $\cdot O_2^-$, $\cdot OH$ und Singulett-Sauerstoff, O_2^*, angenommen, weniger H_2O_2 oder Schwefelradikale. Drei Enzyme greifen in die Sauerstoffradikalkette ein: Superoxid-Dismutase (SD), Katalase und Glutathionperoxidase (GSH-POD). Während der Lipidperoxidation entsteht aus der mehrfach ungesättigten Fettsäure ein Fettsäurehydroperoxid (mit konjugierter Doppelbindung), das durch GSH-Peroxidase in sein Hydroxy-Derivat überführt und somit daran gehindert werden kann, spontan zu vernetzten Folgeprodukten weiter zu reagieren.

Da der Ausfall von Glutathionperoxidase offenbar zu Zellschäden führen kann, stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, welchen Einflüssen die Glutathionperoxidase-Aktivität in der Zelle unterliegt. Die Abhängigkeit von ihrem Donorsub-

strat GSH wurde mit den kinetischen Ergebnissen referiert. Es ist danach kaum zu erwarten, daß geringe Schwankungen des zellulären GSH-Spiegels sich auf die Eliminierung von Hydroperoxiden auswirken. Normalerweise wird die GSH-Konzentration kaum in den Bereich absinken, in dem das Akzeptorsubstrat geschwindigkeitslimitierend wird. Bei Störungen in der NADPH-Produktion oder der GSH-Reduktion werden allerdings Symptome manifest, die auf eine verminderte Wirkung von Glutathionperoxidase zurückgeführt wurden[66]. Dazu gehören hämolytische Krisen, die nach oxidativer Belastung durch bestimmte Medikamente oder durch Bestrahlung auftreten können. Abbildung 2 skizziert den Zusammenhang zwischen Glutathionperoxidase und den Reaktionen des Glutathionstoffwechsels.

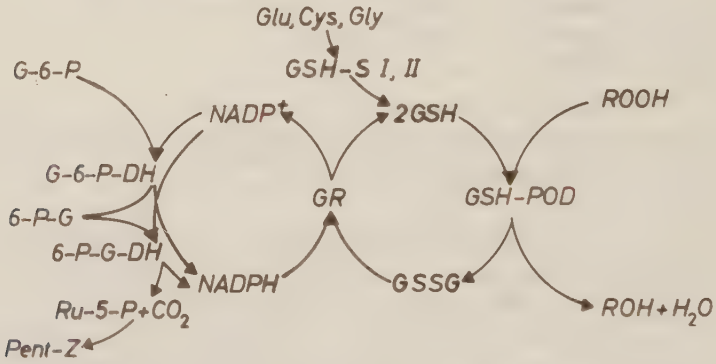


Abb. 2: Zur Donorsubstrat-Versorgung von Glutathionperoxidase (GSH-POD) in Erythrocyten.

1. Synthese von GSH durch die beiden Glutathion-Synthetasen (GSH-S I,II)
2. Reduktion oxidierten Glutathions, GSSG, durch Glutathion-Reduktase (GR)
3. Versorgung von Glutathionreduktase mit Reduktionsäquivalenten, NADPH, über die ersten Schritte des Pentosephosphat-Wegs (Pent-Z): G-6-P = Glucose-6-phosphat; G-6-P-DH = Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase; 6-P-G = 6-Phosphogluconat; 6-P-G-DH = 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase; Ru-5-P = Ribulose-5-phosphat.

Ob die physiologischen Inhibitoren von Glutathionperoxidase, ATP und CoA-SH, in vivo von Bedeutung sind, ist unbekannt. Little et al.[137] leiten von der Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition von GSH-Peroxidase ab, daß dieses Enzym in Erythrocyten oder Mitochondrien partiell gehemmt vorliegt und von ATP oder Coenzym A allosterisch reguliert wird[137, 136]. Eine solche Regulation ist jedoch funktionell nicht verständlich, wenn sich die Aufgabe von Glutathionperoxidase lediglich auf die Elimination eines Schadstoffs beschränkt.

Die Glutathionperoxidase-Aktivität der Gewebe unterliegt möglicherweise einer hormonalen Kontrolle. Als Hinweise dafür gelten ihre ausgeprägte Alters- und Geschlechtsabhängigkeit in Ratten[46, 190]. Pinto und Bartley[191, 192] vermuteten einen kompensatorischen Effekt in der östrogenabhängigen Steigerung der Glutathionperoxidase-Aktivität, da sich gleichzeitig das Lipidmuster zu höherer Autoxidationsfähigkeit veränderte. Die Geschlechtsabhängigkeit der Glutathionperoxidase ließ sich in Blut und Leber, nicht dagegen in steroidmetabolisierenden Geweben bestätigen[138]. Welcher Mechanismus der Regulation zugrunde liegt, ist unbekannt. Pinto und Bartley[192] vermuten einen Einfluß des [GSH] / [GSSG] -Quotienten. Über den NADPH-Verbrauch von Glutathionreduktase könnte die Glutathionperoxidase-Reaktion auf den Funktionszustand der allosterisch regulierten Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und damit auf den Pentosephosphatzyklus einwirken[106].

Glutathionperoxidase war in gesundem und malignem Rattengewebe durch H_2O_2 beziehungsweise durch Hemmung von Katalase nicht induzierbar[161].

Es mag erstaunen, daß in den bisher referierten Eigenschaften von Glutathionperoxidase keine Beziehung zu Selen hergestellt wurde. Die einzigen Indizien jedoch, die in diesem Abschnitt auf einen Selengehalt von Glutathionperoxidase hätten hinweisen können, sind

1. die ungewöhnlich schnelle Oxidation von Enzym durch H_2O_2 und
2. die Membranschutz-Funktion von Glutathionperoxidase.

Beide Eigenschaften wurden erst in jüngster Zeit abgesichert[73, 280]. Es nimmt deshalb nicht wunder, daß die weiteren Anstöße zur Entdeckung des Selengehalts in GSH-Peroxidase von Seiten ihrer biologischen Funktion und dort über die intensiv verfolgte Frage der biologischen Rolle von Selen kamen. Die dafür wichtigsten Entwicklungen in der Biochemie von Selen sollen im nächsten Abschnitt behandelt werden.

1.2. Zur Biochemie von Selen*

1.2.1. Die toxische Wirkung von Selen

Selen wurde 1817 von Berzelius und Gahn entdeckt. 1842 stellte Japha im Tierversuch die Toxizität von Selen fest[115]. Anfang der Dreißiger Jahre dieses Jahrhunderts wurden bestimmte, regional begrenzte Krankheitserscheinungen im Viehbestand des amerikanischen Mittelwestens als chronische ("alkali disease") beziehungsweise als akute ("blind stagger") Selenvergiftungen erkannt. Ursache der Vergiftungen waren im einen Falle überdurchschnittliche Selenkonzentrationen im Futtergetreide, im anderen Falle der Genuß von Selen speichernden Pflanzen. Dazu zählen besonders einige Arten der Gattung Astragalus aus der Familie der Schmetterlingsblütler. Diese Pflanzen bevorzugen selenhaltige Böden und akkumulieren daraus Selen unbeschadet zu Konzentrationen bis über 1o ooo ppm[116]. Die meisten Getreidesorten enthalten dagegen unter denselben Voraussetzungen zwei bis drei Größenordnungen weniger Selen. Sie unterscheiden sich andererseits von einer dritten Kategorie von Pflanzen, die auf selenhaltigen Böden schlecht gedeihen. Der durchschnittliche Selengehalt des Bodens wird mit 0,2 ppm angegeben.

Zu den Symptomen der chronischen Selenvergiftung bei Tieren zählen Haarausfall, wunde und schorfige Hufe oder Nägel, Leberzirrhose, Herzmuskelatrophie und Anämie. Die akute Selenvergiftung führt über Blindheit, Bauchschmerzen, Speichelfluß, allgemeine Paralyse und Atemstörungen in kurzer Zeit zum Tode. Die Toxizität selenreicher Nahrung kann durch Protein oder Leinsamenmehl, sowie durch Arsenit, Arsenat oder Arsonsäuren verringert werden. Anorganisches Sulfat konkurriert mit Selenat bei der Resorption in Pflanzen und senkt damit deren Toxizität. Brombenzol fördert die renale Ausscheidung von Selen.

Obwohl eine selenabhängige Hemmung von Succinat-Dehydrogenase als Angriffspunkt der Selen-Toxizität diskutiert wurde[170], sind die umfassenderen biochemischen Zusammenhänge auf diesem Gebiet noch ungeklärt.

---

* vgl. l.c.[261, 262, 116, 178, 119, 4]

1.2.2. Selen als essentielles Spurenelement

In amerikanischer Brauhefe fand Schwarz einen Faktor, der analog zu Vitamin E die durch Tocopherolmangel hervorgerufene Lebernekrose der Ratte beheben konnte[207]. Die Effizienz des "Faktor 3" genannten Wirkstoffs erwies sich mit seinem Selengehalt korrelierbar. Selenit verhinderte die durch Torulahefe-Diät induzierte Lebernekrose der Ratte schon in Spuren[208, 210]. "Exudative diathesis", eine Vitamin E-Mangelkrankheit der Vögel, war ebenfalls durch "Faktor 3" oder Selenit zu heilen[209]. Es zeigte sich im weiteren, daß ein großer Teil der bekannten α-Tocopherolmangelerscheinungen durch Selenit günstig beeinflußt oder behoben werden konnte. Während einige dieser Mangelsymptome durch Selen völlig unbeeinflußbar blieben, übertraf in anderen Fällen die Selentherapie die Wirkung von Vitamin E in quantitativer und qualitativer Sicht. Diese Inkongruenz der Wirkungsspektren und die Feststellung, daß trotz hoher α-Tocopherolgaben selenabhängige Mangelerscheinungen auftreten können[253, 157, 276], bestätigen Selen als eigenständiges essentielles Spurenelement. Nach ihrer Beeinflußbarkeit durch Vitamin E wurden die Selen-α-Tocopherol-Mangel-Symptome in vier Gruppen gegliedert (Tabelle 1)

Tabelle 1: Unvollständige Zusammenstellung der Mangelsymptome, die von Selen oder Vitamin E beeinflußt werden können.

I. Selengaben ohne wesentlichen Einfluß[240, 269, 126]:

Tierart	Beeinflußter Zustand
Ratte	resorptive Sterilität; Muskel- und Zahnpigmentierung; Glucose-unabhängige Hämolyseneigung
Küken	Encephalomalazie
Kalb, Lamm, Kaninchen	gesteigerte Autolyse des Nierengewebes; experimentelle Muskeldystophie (durch hohe Nahrungslipidkonzentrationen induziert).

II. Selen und Vitamin E zeigen etwa gleiche Effektivität:

Tierart	Beeinflußter Zustand
Ratte	Lebernekrose;
Schwein, Maus	Lebernekrose; Herzmuskelerkrankungen (mulberry heart disease);
Vögel	Ödeme und subkutane Hämorrhagien (exudative diathesis); Herzmuskelerkrankungen (mulberry heart disease).

III. Selengaben übertreffen die Wirkung von Vitamin E[206, 145]:

Lamm, Kalb	allgemeines Wachstum; Fruchtbarkeit; Muskeldegeneration (white muscle disease);
Schwein	nahrungsbedingte Leberschädigung (hepatosis dietetica).

IV. Mangelerscheinungen trotz hoher Vitamin E-Gaben[253, 196,157,276]:

Ratte	verzögerte Entwicklung der Hodenfunktion; glucoseabhängige Hämolyseneigung; Augenschäden; Störungen von Wachstum, Vermehrung und Haarwuchs (Schäden wurden erst in der ersten Filial-Generation manifest);
Vögel	Wachstumsstörungen von Muskel, Leber und Pankreas.

Als gemeinsamer Nenner der Mangelsymptome kann zunächst die Gewebsnekrose gelten, die sich in den verschiedenen Organen je nach Spezies in unterschiedlichem Maß auswirkt. So dominiert zum Beispiel der Herzschaden bei der Maus, bei der Ratte hingegen die Lebernekrose. Der Selenmangel entwickelt sich aus einer latenten Phase ohne anomale Anzeichen über Stoffwechselstörungen, Degeneration von endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrienschwellung zu tiefgreifenden Zellschäden[218]. Diese Erscheinungsformen werden präzisiert durch histologische Untersuchungen, die zeigten, daß die Ödeme und Hämorrhagien der

"exuativen Diathesis" auf der erhöhten Permeabilität der Kapillarendothelien beruhen[44]. Entsprechend wurde bei Untersuchungen der ultrastrukturellen Veränderungen im Verlauf der "mulberry-heart-Krankheit" von Schweinen festgestellt, daß das Kapillarendothel und die nicht-myelinisierten Nerven noch zeitlich vor dem Herzmuskel gestört werden[245]. Diese Effekte sind nicht speziell auf ihre Abhängigkeit von Selen überprüft; es wurde jedoch versucht, die molekularen Ursachen der Permeabilitätsänderung mit einer selenabhängigen Funktion von Membranproteinen zu erklären[119]. Nach Untersuchungen an Membranen der Rattenleberzelle während der pränekrotischen Phase wurde die Membranläsion als Ursache der Zellnekrose jedoch angezweifelt[144].

Die Vielfalt der Mangelphänomene deutet auf grundlegende Stoffwechselentgleisungen als Ursache des Tocopherol-Selen-Mangels und spricht damit indirekt für bedeutsame Stoffwechselfunktionen von Selen. Zunächst soll der Stoffwechsel selenhaltiger Substanzen diskutiert werden. Im weiteren werden vermutete zelluläre Angriffspunkte der kooperativen beziehungsweise individuellen Wirkung von Vitamin E und Selen vorgestellt.

1.2.3. Zum Stoffwechsel von Selenverbindungen

Die Fragen,

1. auf welche Weise anorganisches Selen verstoffwechselt wird,
2. ob Selenit in Selenoaminosäuren umgebaut werden kann und
3. in welcher Form Selen in Proteinen gebunden vorliegt,

sind für die biologische Funktion von Selen wie für die mechanistische Betrachtung des selenhaltigen Enzyms Glutathionperoxidase gleichermaßen von großer Bedeutung. Sowohl organisch gebundenes Selen wie Selenoaminosäuren, selenhaltiges Pflanzenmaterial oder "Faktor 3", als auch anorganisches Selen, wie Selenit oder Selenat, können Selenmangel mit vergleichbarer Effektivität beheben[219]. Die Toxizität der meisten anorganischen und organischen Selenverbindungen ist vergleichbar[78]. Beide Selenformen führen im Organismus zum gleichen Ausscheidungsprodukt, Trimethylselenonium[184]. Diese Feststellungen sprechen für einen aktiven kommunizierenden Stoffwechsel der Selenverbindungen.

Andererseits stützen quantitative[220, 29, 164] und zeitliche[55, 113] Unterschiede in der Retention von anorganischem und organischem Selen in Geweben eine differenzierende Betrachtungsweise, zumindest bei höheren Tieren und während der ersten Phasen der Selen-Assimilation.

In Abbildung 3 sind einige Stoffwechselwege der Selenverbindungen skizziert (vgl.l.c.[4]).

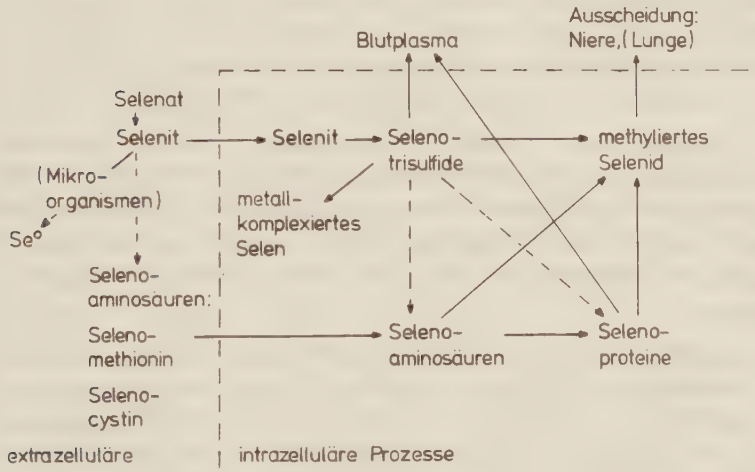


Abb. 3: Übersicht über die angenommenen Stoffwechselwege von Selen in Tieren

---- Trennlinie zwischen extra- und intrazellulären Vorgängen

- - - ▸ ungeklärte Transformationen, die zu einer Assimilation von anorganischem Selen führen könnten

1.2.3.1. Stoffwechsel von anorganischem Selen

1.2.3.1.1. Der Selenotrisulfid-Weg

Ein geringer[118] beziehungsweise verzögerter[164] Umsatz von Selenat im Gewebe sowie eine Gewebsverteilung, die der von Selenit nahekommt[164], sprechen dafür, daß Selenat erst nach Reduktion zu Selenit metabolisiert wird. Für Hefe ist belegt[92],

daß Selenat nicht analog zu Sulfat von ATP aktiviert werden kann, sondern daß der Komplex zu AMP, Pyrophosphat und Selenat zerfällt.

Die Resorption von Selenit aus dem Darm geschieht unreguliert[18] und in der Ratte fast vollständig[18, 252]. Von Schafen wird weit weniger Selenit verwertet[275], möglicherweise wegen partieller Reduktion zu unverwertbarem, elementarem Selen im Wiederkäuermagen[103].

Ein erstaunliches Merkmal des Selenitstoffwechsels ist die schnelle Assimilation dieser anorganischen Verbindung. Der größte Teil alimentären oder injizierten Selenits findet sich nach kurzer Zeit in der Proteinfraktion der Gewebe[152, 164].

In Erythrocyten von Rind[118] und Mensch[133] wird Selenit in einem schnellen Diffusionsprozess gleich anderen Anionen aufgenommen. Während Humanerythrocyten Selen in veränderter Form schnell emittieren[133], verläuft dieser Ausstrom, ein durch SH-Reagenzien hemmbarer Prozess, bei anderen Arten wesentlich langsamer[118].

An Extrakten aus Mäuseleber fand Ganther[82], daß aus Selenit Dimethylselenit entsteht. Diese Transformation impliziert die Reduktion von Selen der Oxidationsstufe +4 zu Selenid und dessen Methylierung. Als Methyldonor wurde Adenosylmethionin angenommen[82]. Die Reduktion erwies sich als GSH-abhängig[82] und folgte der Stöchiometrie der von Painter formulierten, nichtenzymatischen Bildung von Selenotrisulfiden[183, 83] (1,3-Dithia-2-selenane[95]):

$$4\ R\text{-}SH + H_2SeO_3 \longrightarrow R\text{-}S\text{-}Se\text{-}S\text{-}R + R\text{-}S\text{-}S\text{-}R + 3\ H_2O \quad .$$

Als wesentliches Zellthiol kommt primär GSH für die Reduktion von Selenit in Frage. Selenodiglutathion gilt deshalb als Zwischenprodukt der Dimethylselenidsynthese in der Mäuseleber[83] und als der Metabolit, der nach Selenitbehandlung aus dem Erythrocyten transportiert wird[118]. Der Ausstrom von Selenodiglutathion könnte dem aktiven Transport von oxidiertem Glutathion aus Erythrocyten[241] und Leberzellen[161] entsprechen[118].

Analog zu GSSG wird Selenodiglutathion auch von Glutathionreduktase umgesetzt[83, 85]:

$$GS\text{-}Se\text{-}S\text{-}G + NADPH_2 \rightarrow GSH + GS\text{-}SeH + NADP \quad ,$$

Das entstehende Selenderivat dürfte instabil sein und soll entweder durch Methylierung zu GSH und Dimethylselenid zerfallen[85], oder als Selendonor für die hypothetischen, selenhaltigen Nicht-Häm-Eisen-Proteine des Diplock-Lucy-Modells[53] dienen[52] (siehe 1.2.4.1.5.).

Obwohl diese Reaktionsfolge schlüssig erscheint, sind doch Zweifel an ihrer Relevanz für den Zellstoffwechsel angebracht. Selenotrisulfide sind bei niederen pH-Werten mäßig stabil[83], zerfallen dagegen leicht in alkalischer Lösung[183]. Reaktionsprodukte von GSH und Selenit waren nur dann im physiologischen pH-Bereich faßbar, wenn der Quotient GSH/Selenit den Wert 4 nicht überstieg[202]. Bei einem normalen GSH-Gehalt zum Beispiel von Erythrocyten (ca. 2 mM)[193] dürfte dieses Verhältnis kaum erreicht werden. Eine rasche Disproportionierung von Selenodiglutathion scheint damit wahrscheinlich[202].

Außerdem zerfällt Selenodiglutathion in aerober und alkalischer Lösung zu Selenit und oxidiertem Glutathion nach der Gleichung[258]:

$$GS\text{-}Se\text{-}SG + O_2 + 2\ OH^- \rightarrow GSSG + H_2O + SeO_3^{2-} \quad .$$

Daß diese Reaktion unter physiologischen Bedingungen von Bedeutung ist, geht aus den Untersuchungen von Ganther hervor, der unter anaeroben Bedingungen eine vielfache Steigerung der Dimethylselenidsynthese beobachtete[82]. Der oxidative Zerfall von Selenodiglutathion schließt aber mit der Regeneration von Selenit einen Circulus vitiosus, der zur Erschöpfung der zellulären GSH-Reserven führt oder, mit Hilfe von Glutathionreduktase, die nutzlose Oxidation von $NADPH_2$ durch Sauerstoff katalysiert. Aus dieser Sicht müßte der aktive Transport von Selenodiglutathion aus der Zelle als Schutzmechanismus angesehen werden.

Die wesentlichen Schritte dieser Reaktionsfolge verlaufen nichtenzymatisch[83, 258]. Über eine Stabilisierung der Zwischenprodukte durch α-Tocopherol liegen nur Vermutungen vor[52]. Es

erscheint deshalb zweifelhaft, ob Selenid auf einem derart unkontrollierbaren Weg in ein essentielles Funktionszentrum wie das postulierte Elektronentransfersystem[53] des Diplock-Lucy-Modells eingebaut wird.

Da auch die Bildung flüchtigen Dimethylselenids an Stelle des Hauptausscheidungsprodukts Trimethylselenonium[25, 184] als Notbehelf bei der Inaktivierung toxischen Selens angesehen werden kann[52], ist die metabolische Funktion dieses Stoffwechselweges nicht ersichtlich. Statt günstiger Auswirkungen im Sinne einer Selenmangel-Supplementation wären toxische Erscheinungen nach Selenitgaben vorauszusehen.

Ein Ausweg aus diesem Dilemma könnte sich in der Möglichkeit bieten, daß Protein-Sulfhydrylgruppen analog zu GSH oder über einen Selenotrisulfid-Austausch zu Selenotrisulfid-Proteinen reagieren. Unter unphysiologischen Bedingungen und nach Reduktion der Disulfidbrücken kann Ribonuklease in ein inaktives Selenotrisulfid-Derivat überführt werden[84]. Da Selenotrisulfide in saurer Lösung hinreichend stabil erscheinen[83], lassen sich nach Säurefällung der Proteine Selenotrisulfid-Proteine und selenoaminosäurehaltige Proteine nicht unmittelbar unterscheiden. Selenotrisulfid-Proteine werden als Selenspeicher angesehen[84]. Funktionen werden weiter in der Kontrolle der Membranpermeabilität vermutet[119]. Die Bildung gemischter Selenotrisulfidderivate aus niedermolekularen Thiolen und essentiellem Proteinsulfhydryl wird einerseits als Oxidationsschutz[118] andererseits als eine Ursache der Selenit-Toxizität angesehen[52].

In Abbildung 4 sind die diskutierten Reaktionen zusammengestellt.

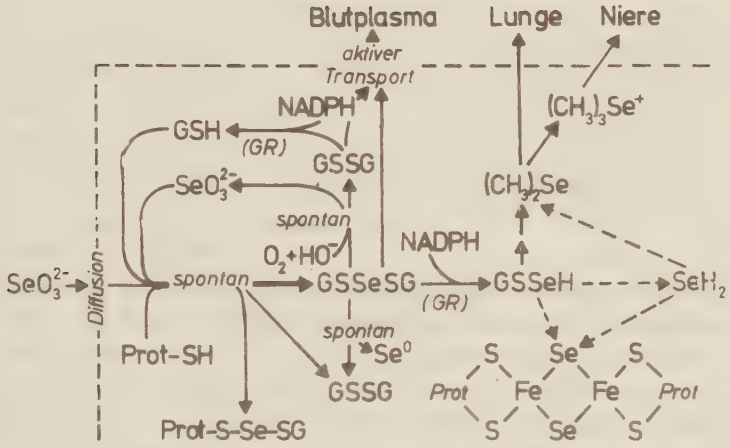


Abb. 4: Übersicht über die postulierten Reaktionsschritte des Selenotrisulfid-Wegs.
– – – markiert die Zellmembran

Als zentrales Produkt aus Selenit und zellulärem GSH wird Selenodiglutathion (GS-Se-SG) betrachtet. Diese Verbindung kann:

1. **disproportionierend** zerfallen[202],
2. spontan zu Selenit und GSSG oxidiert werden[258],
3. aktiv aus der Zelle transportiert werden[118],
4. von Glutathion-Reduktase (GR) umgesetzt werden[83, 85].

Von dem Produkt GS-SeH führen Wege:

1. zu den methylierten Seleniden (Ausscheidungsformen),
2. zu SeH_2 und zu den vermuteten selenhaltigen Nicht-Häm-Eisen-Proteinen (mit – – – → markiert).

Als Beispiel der angenommenen Protein-Selenotrisulfide ist Prot-S-Se-SG angegeben[118].

1.2.3.1.2. Diskussion alternativer Selenit-Transformationen und Selen-Bindungen

Nachdem bekannt war, daß alimentäres Selenit in Protein eingebaut wurde[152], und daß Pflanzen[111] und Mikroorganismen[15, 260] aus organischem Selen Selenoaminosäuren aufzubauen vermögen, schien es naheliegend, daß in Tiergewebe Selenit über Selenoaminosäuren in Protein inkorporiert wird. Über die Isolierung von Selenomethionin und Selenocystin aus Wollhydrolysaten[195], aus dem Keratin[151] und Leberprotein[150] von Hunden nach Behandlung mit markiertem, 4-wertigem Selen wurde berichtet.

Diese Befunde können jedoch in mehreren Punkten angezweifelt werden. Angesichts der Stabilität von Selenotrisulfiden in saurem Medium darf nicht unmittelbar aus der Nicht-Dialysierbarkeit von Selen auf eine Beteiligung von peptidgebundenen Selenoaminosäuren geschlossen werden. Hydrolyse der selenhaltigen Proteine mit oN HCl schädigt beide Selenoaminosäuren[15], besonders Selenocystin[112]. Selenit, ein mögliches Zersetzungsprodukt von Selenotrisulfiden, bindet sich besonders bei niederen pH-Werten in ungeklärter Weise an schwefelhaltige Substanzen[214] und täuscht damit die Anwesenheit von Selenoaminosäuren oder von deren Abkömmlingen vor[41]. Durch diese Komplikationen wurde die Papierchromatographie, eine ohnehin unbefriedigende Trennmethode für Selenaminosäuren[116, 260], bei der Identifizierung der Hydrolyseprodukte selenhaltiger Proteine überfordert.

Cummins und Martin[41] konnten in Urin von Kaninchen, die mit markiertem Selenit behandelt worden waren, keine signifikanten Hinweise auf Selenoaminosäuren finden. Die Verteilung der Radioaktivität im Aminosäureanalyzer-Diagramm entsprach mehr der unspezifischen Anlagerung von Selenit an schwefelhaltige Substanzen. Durch alkalische Dialyse von Leberprotein konnten mehr als 90% der Radioaktivität entfernt werden. Die anschließende enzymatische Hydrolyse setzte die restliche Radioaktivität als anorganisches Selen frei. Die Autoren schlossen aus ihren Ergebnissen, daß zu-

mindest in Kaninchen kein Stoffwechselweg von Selenit zu Selenoaminosäuren führt. Jenkins[117] kommt in einem Vergleich zwischen der Inkorporation von Selenit und Selenomethionin in Plasmaproteine von Hühnern zu einem ähnlichen Ergebnis.

Möglicherweise können aus Untersuchungen über die Transformationen radioaktiven Selenits in Plasma von Selenmangel-Ratten[164, 23, 24] Hinweise auf einen Stoffwechselweg gewonnen werden, der eine Alternative zur Bildung von Selenotrisulfiden aus Selenit darstellt. Schon wenige Minuten nach Injektion von ^{75}Se-Selenit fällt der Gehalt an gelfiltrierbarem Selen im Plasma auf Kosten des Selengehalts der Leber ab. Kurz darauf erscheint Selen aber wieder u.a. an eine Plasmakomponente gebunden, deren Molekulargewicht durch Gelchromatographie auf 80000 geschätzt wurde[23]. Die zu diesem Zeitpunkt markierten Proteine scheinen der α_2- und β-Globulinfraktion anzugehören[153]. 6 bis 24 Stunden nach der Injektion überwiegt der Selengehalt in weiteren Proteinfraktionen, die den Makroglobulinen zugeordnet werden konnten[23].

Da diese Vorgänge durch in vitro-Inkubation von Selenit mit Blutplasma nicht reproduziert werden konnten, wurde geschlossen, daß der Fixierung von Selen in den verschiedenen Globulinfraktionen eine Modifizierung von Selenit, wahrscheinlich während der Leberpassage oder in den Erythrocyten, vorausgehen muß[164, 133, 24]. Wenige Hinweise auf die Bindungsweise von Selen an die Globulinfraktionen sind bisher bekannt[23, 24, 117, 147]. Die Bindung unterscheidet sich zuerst von der wohl adsorptiven Beziehung von Selenit zu Albuminen während der ersten Phase (carrier phase)[147] durch ihre Stabilität während der Gelfiltration[23]. Bei der Elektrophorese oder Ionenaustauschchromatographie entstanden dagegen teilweise Selenverluste[24]. Durch Dialyse in alkalischem Medium wurde Selen schnell freigesetzt[23, 24, 117], ein Befund, der sich mit dem von Cummins und Martin[41] an Leberprotein deckt.

Eingehende Untersuchungen von Millar und Mitarbeitern[162-4] an Ratten, denen Selen in verschiedener Form injiziert wurde, geben zu Zweifeln am Aussagewert der Dialyse in alkalischem Milieu Anlaß. Durch diese Behandlung scheint das Protein stark

geschädigt zu werden[162]. Zum anderen zeigen die selenhaltigen Proteinfraktionen von Tieren, die mit Selenit oder mit Selenomethionin behandelt wurden, neben deutlichen Verschiedenheiten überraschende Gemeinsamkeiten (zum Beispiel in der Selenverteilung im Plasma) besonders nach längerer Inkubationsdauer[164]. Die Autoren vermuten, daß möglicherweise Selenomethionin partiell zu einer Selenverbindung abgebaut wird, die gleich Selenit oder Selenat metabolisiert wird.

Da die entsprechende Selenbindung, abgesehen von der ersten Phase der Behandlung, gegenüber einer Behandlung mit Thiolen relativ stabil war[164, 24], scheint gesichert, daß Selen hier nicht in einer Selenotrisulfidgruppierung gebunden ist[24].

Alternative Vorstellungen zum Bindungszustand von Selen in diesem Proteinen existieren nicht. Möglicherweise liegt Selen assimiliert in einer Se-C-Bindung vor. Daß Selen im Organismus offenbar auch in anderer Form gebunden werden kann, geht aus seinen Beziehungen mit Schwermetallen hervor (siehe 1.2.4.2.2.). Über eine in Ihrer Natur ungeklärte selenhaltige Lipidkomponente aus Fischölen berichtete kürzlich Lunde[142, 143]. Weiterhin bleibt auch offen, welche Selen-Verbindung sich hinter der Bezeichnung "Faktor 3" von Schwarz und Foltz[208] verbirgt. Systematische Untersuchungen von Schwarz und Fredga[216] zeigten, daß bestimmten aliphatischen Monoseleno- und Diseleno-Dicarboxylsäuren wesentlich höhere biologische Wirksamkeit zugesprochen werden konnte als Selenit. Dabei erwiesen sich die ungeradzahligen Carbonsäureketten bei den Monoseleniden weitaus wirkungsfördernder als ihre geradzahligen Homologen. Bei den Diseleniden zeigte sich ein Wirkungsminimum bei 7 C-Atomen pro Carbonsäurekette. Da die Effektivität dieser Substanzen summarisch an ihrer Schutzwirkung vor Lebernekrose gemessen wurden, können die gefundenen Gesetzmäßigkeiten jedoch kaum im Sinne bestimmter Stoffwechselvorgänge gedeutet werden.

1.2.3.2. Vorkommen und Stoffwechsel von Selenoaminosäuren

Wenn auch Selenoaminosäuren dem Organismus der Tiere nicht in erforderlichem Maß aus anorganischem Selenit zugänglich sein sollten, so können organische Selenverbindungen doch durch Nahrungsprotein und in Wiederkäuern möglicherweise über Mikroorganismen des Wiederkäuermagens[102] in den Stoffwechsel gelangen.

In Pflanzen treten Selenoaminosäuren in Peptiden gebunden[263] und, besonders in Selen speichernden Pflanzen, in freier Form auf. Da die Gliadin- und Glutelinfraktionen, die aus toxischem Getreide isoliert worden waren, selbst Selenvergiftung hervorriefen, vermuteten Horn und Jones in peptidgebundenen Selenoaminosäuren die ursächlich toxischen Verbindungen[110]. Den selben Autoren gelang es, einen selenhaltigen Aminosäurenkomplex aus einer Astragalus-Art zu isolieren und als Selenocystathionin zu identifizieren[111]. Seither wurden aus verschiedenen pflanzlichen Quellen die Selenanalogen der Schwefelaminosäuren[173, 174] und deren Methylierungsprodukte Se-Methyl-Selenocystein[256] und Se-Methyl-Selenomethionin[187] isoliert. Die methylierten Selenoaminosäuren liegen ungebunden vor[148]. Se-Methyl-Selenocystein dominiert in Selen speichernden Pflanzen[235]. Eine Arbeit berichtet von der Isolierung von Selenomethionin aus Weizenprotein nach enzymatischer Verdauung durch Pronase[180]. Selenocystin konnte nicht nachgewiesen werden.

Ein Stoffwechselweg von Selenomethionin zu Se-Methyl-Selenocystein in Astragalus bisulcatus wurde vorgeschlagen[36] und mit Markierungsstudien belegt[37]. Als Zwischenstufen treten wahrscheinlich Selenocystathionin und Seleno-Adenosylhomocystein auf, eine Substanz, die in Bakterien nachgewiesen wurde[236]. Über die Synthese von Selenoaminosäuren aus anorganischem Selen in E. coli[260] und Bäckerhefe[15] wurde berichtet.

Als Indiz für die Präsenz von Selenocystin in Tieren galt die Förderung der Selenausscheidung durch Brombenzol bei Hunden nach toxischen Selendosen[170]. Der Stoffwechsel von Selenoaminosäuren ist zunächst geprägt von der Parallelität zum Metabolismus der Schwefelaminosäuren[185]. Die Konkurrenz von

Selenocystin und Cystin bei der Absorption in leukämische Leukocyten wurde therapeutisch zu nutzen versucht[268]. Die Anwendung blieb jedoch wegen der Toxizität der Selenverbindung ohne Erfolg. Selenomethionin konkurriert mit Methionin in der energieabhängigen Resorption im Dünndarm[155]. Die bedeutsamste Parallelität im Stoffwechsel dieser konkurrierenden Aminosäuren scheint im gemeinsamen Aminoacylaktivierungs-Mechanismus vorzuliegen[108, 156]. Selenomethionin wirkt in E. coli als kompetitiver Inhibitor der Methionin-Transfer-RNS-Synthetase und wird, bei vergleichbarem K_m, wie Methionin aktiviert und in die Polypeptidkette eingebaut[108]. An einem System aus Rattenleber wurden entsprechende Verhältnisse nachgewiesen[156]. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtung, daß Selenomethionin in in Organen angereichert wird, die viel Protein synthetisieren[230, 177], zum Beispiel in Pankreas, Nebenschilddrüse und Leber. Hierauf gründen sich verschiedene diagnostische Verfahren, die radioaktives ^{75}Se-Selenomethionin als "Tracer" zum "Scannen" und zur Funktionsprüfung von Organen verwenden[16, 176, 56, 54].

Die Grenzen der Anwendbarkeit von Selenoaminosäuren als Analoge der Schwefelaminosäuren sind durch die Unterschiede der molekularen Eigenschaften dieser Moleküle[112] und deren Stoffwechsel[7, 6, 8] gesetzt. Der kompetitive Einbaumechanismus müßte zur Folge haben, daß Selenomethionin völlig unspezifisch in alle entstehenden Proteine eingebaut wird. Es stellen sich die Fragen, wie sich der Einbau von Selenomethionin auf die konformativen und funktionellen Eigenschaften der betroffenen Proteine auswirkt und ob Hinweise auf einen von diesen Vorstellungen abweichenden spezifischen Einbau vorliegen. Wenn durch den Einbau von Selenomethionin eine funktionelle Einheit geschaffen werden soll, muß erwartet werden, daß dieser Vorgang kontrolliert und nicht zufällig erfolgt.

An einer Mangelmutante von E. coli zeigte sich, daß dieser Organismus den Verlust der Methionin-Biosynthese durch Selenomethionin im Nährmedium kompensieren konnte[39]. In Chlorella vulgaris hemmte jedoch Selenomethionin trotz unveränderten Wachstums die Zellteilung[233]. Es wurde deshalb vermutet, daß der Teilungsmechanismus durch die Modifizierung funktioneller Proteine beeinträchtigt wurde[234].

In Tiergeweben wurde ein unerwartet geringer Einbau von Selenomethionin festgestellt[164]. Die relativ spezifische Markierung von Plasmaproteinen nach Behandlung mit radioaktivem Selenomethionin[164, 229] könnte indirekt für einen differenzierenden Einbau dieser Aminosäure sprechen. In Anbetracht der ähnlichen Selenverteilung nach Behandlung mit Selenit oder Selenomethionin wurde angenommen, daß diese Aminosäure, im Gegensatz zu Methionin, schneller metabolisiert wird und in den Stoffwechsel von Selenit einmündet[164]. Wenn Selenomethionin je durch einen spezifischen Mechanismus in Peptide eingebaut würde, so erwiese sich der beobachtete partielle Abbau als sinnvoll. Damit würde nämlich die Konzentration von Selenomethionin genügend gesenkt, sodaß die Konkurrenz zu Gunsten von Methionin entschieden wäre. Ein spezifischer und möglicherweise sensitiverer Einbau von Selenomethionin erhielte auf diese Weise die erforderliche Selektivität zurück.

1.2.4. Zur biologischen Funktion von Selen

Da die Betrachtung des Selenstoffwechsels nur wenige Anhaltspunkte für die Entstehung und Beschaffenheit einer funktionell essentiellen Selenverbindung geben konnte, sollen nun Untersuchungen diskutiert werden, die hypothetische oder konkrete Hinweise auf Beteiligungen von Selen an biochemischen Prozessen mit der biologischen Funktion dieses Spurenelements verknüpfen. Die Selentoxizität ist weniger geeignet, diese Funktionen aufzuspüren, weil ihren Symptomen vermutlich unspezifische Vorgänge unter anomalen Stoffwechselbedingungen zugrunde liegen. Der Selenmangelzustand und seine Aufhebung durch Selensupplementation eignet sich dagegen besonders, um aus der Differenz der beiden Stoffwechselsituationen auf funktionelle Beteiligungen von Selen zu schließen. Die Interpretation der auf diese Weise gewonnenen Selen-Abhängigkeiten wird jedoch dadurch erschwert, daß dem Selenmangel kein eindeutig definierter Stoffwechselzustand zugeordnet werden kann, und daß "überschüssiges" Selen nach der Supplementierung möglicherweise in nichtfunktionelle Selenverbindungen überführt wird[24]. Die Relevanz der postulierten selenabhängigen Mechanismen muß deshalb an den zellulären Auswirkungen des Selenmangels, dessen

Zusammenhängen mit Vitamin E, und dessen art- und organspezifischer Manifestation gemessen werden.

Die zellulären Grundlagen der Selenmangelsymptome lassen sich in ihren Auswirkungen in zwei Bereiche gliedern:

1. Die Beeinflussung des zellulären Energiestoffwechsels
2. Die Veränderung zellulärer Membransysteme.

Obwohl viele Gemeinsamkeiten beide Begriffe verbinden, soll dennoch versucht werden, die bekannten selenabhängigen Prozesse den einzelnen Sektoren zuzuordnen.

1.2.4.1. Rolle von Selen im zellulären Energiestoffwechsel

1.2.4.1.1. Selenabhängige Decarboxylierungsreaktionen

Auf der Suche nach den metabolischen Ursachen der Lebernekrose bei Ratten fanden Schwarz und Mitarbeiter[211, 212], daß die Zellatmung bei Tocopherol- und Selenmangel schon vor der makroskopischen Manifestation von Zellschädigungen beeinträchtigt war. Supplementierung mit Vitamin E oder "Faktor 3" zeigte unterschiedliche Auswirkungen auf den Rückgang der Zellrespiration an Leberschnitten. Damit schien es möglich, die individuellen Angriffspunkte der beiden Effektoren zu unterscheiden. Da Selenit nicht an isolierten Zellfraktionen wirksam war, mußte angenommen werden, daß anorganisches Selen in der Zelle in die wirksame Form überführt wurde.

Weitere Untersuchungen schlossen die Beeinträchtigung der Atmungskette als primäre Ursache der Respirationsänderung aus[213]. Dagegen konnte gezeigt werden, daß supplementiertes Vitamin E auf die Lipoyldehydrogenase des α-Ketoglutarat-Dehydrogenase-Systems einwirkte[215]. Der selenabhängige Anteil der α-Ketoglutarat-Dehydrogenase wurde in der Decarboxylierungsreaktion vermutet. An der entsprechenden oxidativen Decarboxylierungsreaktion von Pyruvat konnten Bull und Oldfield[22] eine Abhängigkeit von Selen feststellen.

Whanger und Mitarbeiter[271] verglichen den Stoffwechsel in Geweben von normalen Lämmern mit dem von Tieren, die an Muskelnekrose ("white muscle disease") litten. Unterschiede liessen sich im Metabolismus von Glutamat, nicht in dem von Pyruvat

nachweisen. In Muskel und Herz von normalen Tieren wurde aus Glutamat mehr CO_2 entwickelt als in den Geweben von kranken Tieren[272]. Die Autoren folgerten, daß Selen den Metabolismus von Glutamat beeinflußt und sahen damit die Ergebnisse von Schwarz et al.[213] bestätigt.

1.2.4.1.2. Einfluß von Selen auf Ubichinon

Einen möglichen Einfluß von alimentärem Selen und α-Tocopherol auf den Ubichinon-Spiegel und damit auf die Zellatmung in den Geweben von Kaninchen und Ratte diskutierten Green und Mitarbeiter[87]. In den meisten Geweben wurde ein gleichwertiger Effekt von Selen oder Vitamin E auf Ubichinon festgestellt. In Leber dagegen zeigte sich Selen wirksamer als Vitamin E, an Uterusgewebe war die Effektivität entgegengesetzt[88]. Diese Übereinstimmung mit der Organspezifität der α-Tocopherol-Selen-Mangelsymptome wurde als Hinweis auf eine Beeinflussung der Ubichinon-Biosynthese durch diese Effektoren gewertet. Die Bedeutung dieser Ergebnisse wurde inzwischen angezweifelt[131].

1.2.4.1.3. Selenhaltiges Cytochrom

Durch die bisher zitierten Befunde wurde versucht, den Einfluß von Selen auf Stoffwechselvorgänge zu lokalisieren. In jüngster Zeit ist die Anwesenheit von Selen in Stoffwechselsystemen Ziel solcher Untersuchungen. So gelang es vor kurzem dem Arbeitskreis von Whanger, ein Selen bindendes Protein aus Muskel von Lämmern zu isolieren[186, 273]. Da dieses Protein in Lämmern mit Muskelnekrose offenbar nicht vorkommt, wurde eine Induktion der Synthese dieses Proteins durch Selen angenommen. Schon Tompson und Scott hatten angesichts der verringerten Pankreasfunktion bei Selenmangel in Vögeln vermutet, daß Selen die Proteinsynthese beeinflussen kann[251].

Das Molekulargewicht des Proteins, das nur wenig Cystein, Tryptophan und Methionin enthält, wird mit 1o ooo angegeben. Die spektralen Eigenschaften in reduziertem und oxidiertem Zustand zeigen große Übereinstimmung mit denen von Cytrochrom c[274]. Das Vorkommen dieses Proteins in Muskel und Herz, nicht jedoch in Leber scheint gesichert. Die Autoren vermuten

eine Beteiligung des selenhaltigen Cytochroms an mikrosomalen oder mitochondrialen Redoxreaktionen.

1.2.4.1.4. Mikrobielle, selenhaltige Redoxsysteme

Untersuchungen an einigen mikrobiellen Enzymsystemen werfen ein neues Licht auf den Zusammenhang zwischen Energiestoffwechsel und Selen, seit bekannt wurde, daß Formiat-Dehydrogenase aus E. coli[237] und Clostridium thermoaceticum[5], sowie Glycinreduktase aus Clostridium stricklandii[259] und Nitratreduktase aus E. coli[57] offenbar Selen enthalten.

1954 stellte Pinsent fest, daß E. coli unabhängig vom Wachstum Selenit (nicht aber Selenat) benötigt, um aktive Formiat-Dehydrogenase aufzubauen[189]. Enoch und Lester[57] sowie Shum und Murphy[237] bestätigten an verschiedenen Stämmen von E. coli den hinsichtlich der Formiatoxidation essentiellen Nahrungsbedarf an Selen. Selenit und Selenocystin waren weit besser wirksam als Selenomethionin. Unter aeroben Wachstumsbedingungen wurde mit Methylenblau als Elektronendonor nur geringe Aktivität, mit Benzylviologen als Donor keine Aktivität gefunden. Daraus wurde gefolgert, daß die Enzymsysteme sich je nach Wachstumsbedingungen stark unterscheiden. Hier sei erwähnt, daß Hefe bevorzugt unter anaeroben Bedingungen "Faktor-3-Aktivität" hervorbringt[207]. Formiat-Dehydrogenase aus E. coli, auf Medium mit radioaktiv markiertem Selen gezogen, ließ sich anreichern und durch Dichtegradienten-Zentrifugation von den meisten Proteinen abtrennen[237]. Die Enzymaktivität und die Radioaktivität sedimentierten in einer gemeinsamen Bande.

Den entsprechenden Beweis dafür, daß Selen in ein Teilprotein der Glycinreduktase aus C. stricklandii selektiv eingebaut wird, erbrachten Turner und Stadtman[259]. Das Enzym war nur in Anwesenheit von Selenit während der ganzen logarithmischen Wachstumsphase aktiv. Außerdem zogen die Autoren C. stricklandii in ^{75}selenithaltigem Medium und fanden bei der Gelfiltration des Homogenats, daß die "Protein-A-Aktivität" des Glycinreduktase-Komplexes mit der Radioaktivität kochromatographierte.

"Protein A" hat ein Molekulargewicht um 12 000, zeigte keine ausgeprägte Absorption im langweiligen UV-Bereich und ließ sich in reduziertem Zustand durch Jodacetamid hemmen[242]. Selen ist vermutlich kovalent an das Protein gebunden und wird durch 3% $HClO_4$ nicht freigesetzt. Durch 6N HCl oder Oxidationsmittel wird Selen abgespalten[259].

"Protein A" wurde aus C. stricklandii angereichert und in seiner Funktion innerhalb des Glycinreduktase-Systems charakterisiert[242, 259]. Nach diesen Untersuchungen läßt sich diese Redoxkette wesentlich auf ein "Grundsystem" vereinfachen, wenn statt reduzierter Pyridinnukleotide Dithiothreit oder reduzierte Liponsäure als Donoren eingesetzt werden. Weder die ATP-Synthese noch die Glycinreduktion werden von der Modifizierung betroffen. "Protein A", die selenhaltige Komponente, scheint die beiden Reaktionsabläufe zu verbinden. Dieses Protein transferiert offenbar einerseits Elektronen von der pyridinnukleotidabhängigen Redoxkette bzw. dem unphysiologischen Donorthiol auf die eigentliche Glycinreduktase, "Protein B". Andererseits vermittelt sie auch zwischen der Elektronentransferkette und der ATP-Bildung. Die Phosphorestersynthese erfolgt vermutlich in einer nicht charakterisierten Transferase der "Grundeinheit", und kann mit Arsenat entkoppelt werden. In Abbildung 5 ist das Glycin-Reduktase-System aus C. stricklandii nach den zitierten Quellen skizziert.

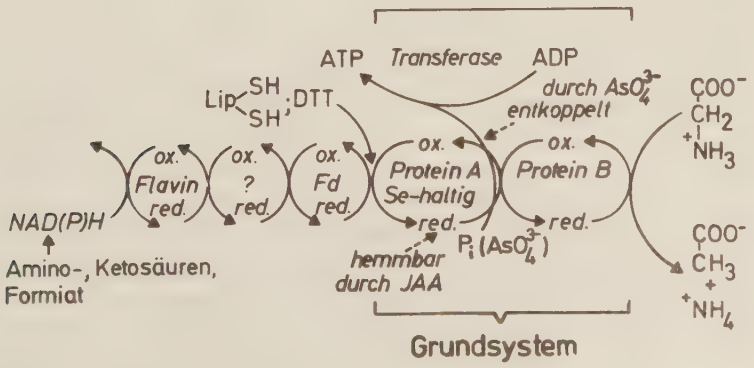


Abb. 5: Übersicht über das Glycin-Reduktase-System aus Clostridium stricklandii (nach l.c.[259, 242]).

Die mehrstufige pyridinnukleotidabhängige Elektronenüberträgerkette bezieht ihre Reduktionsäquivalente aus der Oxidation von Amino- oder α-Ketosäuren (u.U. auch aus Formiat). Ein Flavo-Eisen-Protein (Flavin) überträgt Elektronen auf eine nicht näher bekannte Redoxkomponente. Das selenhaltige "Protein A" erhält Elektronen unter physiologischen Bedingungen von Ferredoxin (Fd). In vitro können reduzierte Liponsäure ($Lip\lesssim^{SH}_{SH}$) oder Dithiothreit (DTT) als Elektronendonatoren dienen. Zur unmittelbaren Glycin-Reduktion überträgt "Protein A" Elektronen auf "Protein B". "Protein A" ist in reduzierter Form durch Jodacetamid (JAA) hemmbar und vermittelt die Übertragung von anorganischem Phosphat (P_i) auf ADP, ein Prozess, der von einer Transferase vollzogen wird. "Protein A", "Protein B" und die Transferase bilden mit weiteren Proteinen das lösliche "Grundsystem".

Formiatdehydrogenase aus C. stricklandii ist möglicherweise ebenfalls selenabhängig. Es wurde deshalb vermutet, daß die selenhaltige Komponente beiden Redoxsystemen angehört. Nitratreduktase aus E. coli soll gleichfalls Selen enthalten, möglicherweise als Selenocystin- oder Nicht-Häm-Eisen-Protein[57]. Dieses Enzym ist Teil eines kompliziert zusammengesetzten Proteinkomplexes, der an bestimmte Zellkompartimente gebunden ist[9]. Neben der Reduktion von Nitrat katalysiert das Enzymsystem auch die Oxidation von Formiat, sodaß eine Kopplung der beiden Reaktionen, wie für C. stricklandii vermutet, möglich erscheint. Damit könnte "Protein A" als ein zentrales Bauelement des mikrobiellen Energiestoffwechsels betrachtet werden. Prinzipiell ähnlich wie die erwähnten Enzymsysteme ist auch der sauerstoffempfindliche Stickstoff-Fixierungskomplex der Nitrogenase aufgebaut[146]. Eine Beteiligung von Selen an diesem Vorgang ist jedoch bisher nicht bekannt.

Parallelen zu den Komplexen der Atmungskette drängen sich auf, wenn berichtet wird, daß das "Grundsystem" der Glycinreduktase wie Komplex III der Atmungskette durch Antimycin A gehemmt wird und vermutlich ein Chinonsystem enthält[242]. Verschiedene Modellsysteme der oxidativen Phosphorylierung basieren auf einer redoxabhängigen Aktivierung von Phosphat durch Schwefelverbindungen[129, 12]. Eine entsprechende Funktion von schwefelanalogem Selen wäre denkbar und auf Grund der zitierten Ergebnisse nicht ausgeschlossen. Allerdings wird eine grundlegende Bedeutung von Selen in Mikroorganismen dadurch eingeschränkt, daß seine Wirkungen von den Wachstumsbedingungen beeinflußt werden kann, und daß das Element für Mikroorganismen offenbar nicht essentiell ist.

1.2.4.1.5. Selen in Nicht-Häm-Eisen-Proteinen und im Diplock-Lucy-Modell

Eine Proteinklasse, die seit einiger Zeit im Verdacht steht, Selen als integrales Funktionselement gebunden zu enthalten, sind die Nicht-Häm-Eisen-Proteine. Als charakteristisches Bauelement und redoxaktive Gruppierung verbindet sie eine geradzahlige Anzahl schwefelkomplexierter Eisenatome. Als Komplexliganden fungieren wahrscheinlich Cysteinsulfhydrylgruppen des Proteins und ebensoviele nicht peptidgebundene Schwefelatome. Durch Säure wird aus diesem Komplex H_2S freigesetzt, "säurelabiles Sulfid", das offenbar aus den nicht assimilierten Schwefelatomen besteht. Im Rahmen von Untersuchungen über die molekularen Eigenschaften von Nicht-Häm-Eisen-Proteinen gelang es, bei verschiedenen Vertretern dieser Proteine Schwefel reversibel gegen Selen auszutauschen[257, 181, 58, 171]. Die modifizierten Komplexe enthielten Schwefel und Selen in gleichem Verhältnis[171], zeigten ins längerwellige verschobene Absorptionsbanden[257, 247] und waren noch biologisch aktiv[257].

Nicht-Häm-Eisen-Proteine sind wahrscheinlich als Bestandteile von mitochondrialer Respiration und mikrosomaler Hydroxylierungssysteme an entscheidender Stelle am Energiestoffwechsel und Wirkstoff-Metabolismus der Zelle beteiligt. Eine Funktion von Selen in diesen Proteinen könnte deshalb die

Selenmangelsymptome als Störung des Energiestoffwechsels oder der mikrosomalen Detoxifizierung erklären. Der Arbeitskreis von Diplock untersuchte deshalb die subzelluläre Verteilung von Selen in Rattenleber, insbesondere von "säurelabilem Selenid", und dessen Beeinflußbarkeit durch Selen, Vitamin E und Phenobarbital[51, 30, 31].

Schon in früheren Untersuchungen war festgestellt worden, daß Selen in allen Zellkompartimenten gebunden wird[152]. Seine Konzentration fällt in der Reihenfolge: löslicher Überstand > Mitochondrien ≫ Mikrosomen > Kerne. Diese Abstufung verändert sich zu Gunsten des mikrosomalen Selengehalts, wenn der Gehalt auf Trichloressigsäure-fällbares Material bezogen[152], oder wenn nach verschiedenen Erscheinungsformen von Selen differenziert wird[51, 30]. Selenwasserstoff, der im Gegensatz zu Dimethylselenid in Silbernitratlösung aufgefangen werden konnte und als Maß für "säurelabiles Selenid" angesehen wurde[52], war von Vitamin E zu beeinflussen[51] und überwog in Mitochondrien und glatten Membranen des endoplasmatischen Retikulums[30, 31].

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen verbanden Diplock und Lucy[53] in einer bestechenden Hypothese mit Überlegungen zur konformativen Integration von Vitamin E in Membranlipidstrukturen. Das Modell versucht, die stabilisierende Wirkung von α-Tocopherol auf ungesättigte Membranlipide und auf "säurelabiles Selenid" hypothetischer selenhaltiger Nicht-Häm-Eisen-Proteine zu erklären. α-Tocopherol soll dazu durch die spezielle Konformation seines Phytylrests so in die Nischen zwischen hoch ungesättigten Fettsäuren eingelagert sein, daß sein redoxaktiver Chroman-Anteil an der Membranoberfläche membrangebundenen Redoxsystemen als Schutz vor oxidativer Schädigung zur Verfügung steht. Das Modell geht damit auf die Beziehungen zwischen Selen und Vitamin E ein, die ein wichtiges Merkmal der α-Tocopherol-Selen-Mängelphänomene darstellen.

1.2.4.2. Funktionen von Selen im zellulären Membranschutz

1.2.4.2.1. Selenverbindungen als Antioxidanzien

Neben der Rolle im Energiestoffwechsel wurde eine biologische Funktion von Selen im zellulären Membranschutz-System vermutet. Das Modell von Diplock und Lucy[53] betrachtet Vitamin E als membrangebundenes Antioxidanz. Es basiert damit zum Teil auf einer Theorie, die auch bei der Suche nach der essentiellen Stoffwechsel-Rolle von Selen herangezogen wurde, um eine sinnvolle Erklärung der Mangelsymptome einerseits und der Abhängigkeiten zwischen Selen, Vitamin E und Schwefelaminosäuren andererseits zu liefern. Die Antioxidanz-Theorie[248] geht von der Vorstellung aus, daß oxidationsempfindliche Zellbestandteile, besonders ungesättigte Membranlipide, ständig dem Angriff von freien Radikalen ausgesetzt sind, die endogen oder von der Umgebung produziert werden. Unter dieser Belastung kann das Membrangefüge zerstört werden, entweder, wenn peroxidierte Membranlipide dessen Struktur sprengen, oder wenn Permeationsmechanismen oxidativ geschädigt werden. Von Antioxidanzien wird nun angenommen, daß sie diese Reaktionsfolge unterbrechen und damit Membranschäden verhindern, die als primäre Ursache des Zelluntergangs angesehen werden. Als notwendige Eigenschaften eines Antioxidanz können daher gelten:

1. die Bildung relativ stabiler Radikale,
2. die Inaktivierung von Schwermetallen, die Radikalbildung fördern oder Membranenzyme schädigen können, und
3. die Fähigkeit, leicht zu einem unschädlichen Produkt oxidiert zu werden.

Diese Kriterien werden von Selen und seinen Verbindungen weitgehend erfüllt. Dialkylselenide sollen bei Bestrahlung ein mesomeriestabilisiertes Radikal bilden[231]. Anorganische Selenverbindungen bilden bekanntermaßen Schwermetallsalze und Selen der Oxidationsstufe -2 wird leicht oxidiert. Organische Selenverbindungen verwendeten Denison und Condit[47] als Antioxidanzien in Schmierölen. Olcott et al.[179] berichteten über die antioxidative Wirkung von Selenomethionin in Fetten und Ölen. Der Arbeitskreis von Tappel setzte sich besonders für die Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften von Selenverbindungen ein[249]. Die Effektivität von Selenverbindungen als

Radikalfänger in Geweben und in Modellsystemen wurde untersucht[14, 100, 277] und an Hand von Bestrahlungsversuchen erhärtet[231, 114, 124]. Selenoaminosäuren zeigten sich dabei den Schwefelaminosäuren überlegen. Zur weiteren Bestätigung der antioxidativen Eigenschaften der Selenoaminosäuren wurde deren Reaktion mit Hydroperoxiden untersucht[26], die als Zwischenstufen der Lipidperoxidation angesehen werden können. Erstaunlicherweise oxidierte Methionin anfänglich rascher auf als Selenocystin, das aber wirksamer in der Zersetzung der Hydroperoxide war. Selenomethionin reagierte unter den Testbedingungen sehr schnell zu einem nicht identifizierten Produkt. Diese Untersuchungen schienen zunächst geeignet, Selen in Form von Selenit, Selenoaminosäuren oder selenhaltiger Proteine den Schwefelaminosäuren und α-Tocopherol als physiologisches Antioxidanz zur Seite zu stellen.

1.2.4.2.2. Beziehungen zwischen Selen und Schwermetallen

Selen scheint auch die Beseitigung von Schwermetallen zu fördern, die als potentielle Radikalbildner oder Enzyminhibitoren an der Schädigung von Membranen beteiligt sein können. Dafür liegen folgende Hinweise vor. Die von Cadmium- oder Quecksilberionen induzierte Mitochondrienschwellung wird vom Selenstatus des Gewebes beeinflußt, nicht jedoch von Vitamin E[169]. Die Vergiftung durch Silberionen führt zu ähnlichen Krankheitserscheinungen wie der α-Tocopherol-Selen-Mangel und kann durch diese Stoffe behoben werden[89]. Es wurde deshalb vermutet, daß die Silberionen essentielles Selen binden und dadurch Selenmangel erzeugen. Das "säurelabile Selenid", das in vitro als Silbersalz bestimmt werden kann, galt als möglicher zellulärer Angriffspunkt der Silberionen[52].

Thunfischgewebe enthält Quecksilber und Selen in außergewöhnlich hohen Konzentrationen[86]. Dabei ist bemerkenswert, daß stets mehr Selen als Quecksilber akkumuliert wird, und daß das Verhältnis zwischen beiden Elementen bei 2:1 liegt. Selen kann Ratten vor Quecksilbervergiftung schützen[86].

Das Selen aus Thunfischgeweben ist dagegen wesentlich weniger wirksam als Selenit. Es wurde deshalb angenommen, daß das Quecksilber in Thunfischgewebe an Selen gebunden ist. Möglicherweise erleichtert Selen auch die Ausscheidung von Quecksilberverbindungen. Ergänzend berichtete Hill[104], daß die Selentoxizität in Hühnern durch Metallionen, speziell durch Quecksilber und Kupfer, gesenkt wurde.

Ganther und Baumann[80] fanden, daß Cadmium die Retention von Selen in Leber erhöht und gleichzeitig die Bildung von methyliertem Selenid hemmt. Entsprechend wurde berichtet, daß Selenit Schäden durch Cadmium sehr viel besser verhinderte als zum Beispiel Zinkacetat[149]. In jüngster Zeit scheint in Metallothionein ein neues Selenprotein gefunden zu sein[200], das diese Ergebnisse konkretisieren könnte. Das Protein mit einem Molekulargewicht von 12 ooo zeichnet sich durch einen sehr hohen Gehalt an Cysteinschwefel aus und enthält komplexiertes Cadmium und Zink[201].

1.2.4.2.3. Einfluß von Selen auf die Karzinogenese

Die antioxidative Wirkung von Selen wurde von Shamberger und Willis[223] dafür verantwortlich gemacht, daß in Landstrichen mit hohem Selengehalt des Bodens die Zahl der Krebstoten niedriger lag als in Regionen mit niedrigem Selenvorkommen. Selen in der Nahrung oder lokal angewandt scheint, vergleichbar synthetischen Antioxidantien[267], in vielen Fällen die Zahl der Krebserkrankungen im Tierversuch zu senken[221, 222, 101].

Dies widerspricht diametral früheren Untersuchungen, die Selenverbindungen als Krebserreger brandmarkten und dazu führten, daß Selenverbindungen zum Beispiel in den USA offiziell als Karzinogene registriert sind[228]. Diese Untersuchungen waren jedoch mit toxischen Selendosen durchgeführt worden. Erst der Vergleich zwischen subtoxisch supplementierten und unsupplementierten Selenmangel-Tieren ergab, daß Selen unter diesen Bedingungen günstig wirkt[222, 101]. Dabei war Selen in Form von Selenit in einigen Fällen an-

deren Antioxidanzien überlegen[222].

Die metabolischen Hintergründe dieser Wirkung von Selen sind noch spekulativ. Von Walker und Ting wurde berichtet, daß Gerste durch Behandlung mit Selenat vor der Meiose eine verringerte Rekombinationsrate aufweist[264]. An Drosophila, die mit Selenoaminosäuren gefüttert war, zeigte sich eine geringere Neigung zu doppeltem "crossing-over" als normal[254]. Diese Tendenz war mit der Selenkonzentration korrelierbar. Die Ergebnisse wurden als selenbedingte Veränderung der chromosomalen Proteinkomponenten interpretiert, die normalerweise zu den Rupturen im Chromatingerüst führen sollen[254]. Shamberger nimmt dagegen an, daß Selen als Antioxidanz die DNS der Zelle vor Peroxidation schützt[224] und damit verhindert, daß sich Karzinogene an das vorgeschädigte Chromosom anlagern[225].

1.2.4.2.4. Wirkung von Selen auf Lysosomen

Auf Grund ihrer labilen Membranstruktur schienen Lysosomen ein günstiges Modell um die antioxidative Wirkung von Selen im Gewebe zu untersuchen. Über erhöhte Lysosomenfragilität bei α-Tocopherolmangel wurde berichtet[278]. Supplementation mit Selenit oder Vitamin E stabilisierte Lysosomen aus Rattenleber[19]. Andere Untersuchungen konnten jedoch die Konzentration alimentären Selens nicht mit der Stabilität von Lysosomen korrelieren[175]. Eine Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase, die in Pankreasgewebe von Hühnern unter Selenmangel als Anzeichen von Lysosomenzerfall aufzutreten schien, wurde mit einer Makrophagen-Invasion in das nekrotische Gewebe erklärt[175, 21].

1.2.4.2.5. Einwände gegen Selen als "klassisches Antioxidanz"

Inzwischen wurde eine Reihe gewichtiger Einwände vorgebracht, die gegen Selen in der Rolle des einfachen Antioxidanz sprechen[119]. Selen ist offenbar nicht in der Lage, Mangelkrankheiten wie Encephalomalazie zu heilen, die von unphysiologischen Antioxidanzien schon in sehr geringen Dosen behoben werden können. Andererseits ist Selen bei "exudativer Diathese"

hoch wirksam, während andere Antioxidanzien nur sehr geringen Einfluß auf diese Mangelsymptome haben. Die hohe Selektivität von Selen in diesen Fällen läßt sich nur unvollkommen durch die ungleiche Gewebsverteilung des Wirkstoffs erklären und widerspricht den Annahmen der Antioxidanz-Theorie, bei der die Wirksamkeit des Effektors lediglich von dessen Konzentration abhängen sollte[90].

Vergleicht man die Konzentrationen von organischen Schwefelverbindungen, α-Tocopherol und Selen, so zeigt sich, daß deren Verhältnis im Gewebedurchschnitt 2000:25:1 ist[178]. Selbst wenn Selenoaminosäuren die mehrfache Effektivität ihrer Schwefelanalogen bei der Verhinderung oxidativer Schäden zugesprochen werden konnte[277], läßt sich die Wirkung von Selen im Gewebe nicht auf die Rolle eines einfachen Radikalfängers zurückführen.

Es war deshalb zu vermuten, daß die antioxidative Wirksamkeit von Selen im Zusammenhang mit seiner Bindung in Proteinen wesentlich verändert und gesteigert werden mußte. Als Erklärung dafür boten sich zwei Möglichkeiten an:

1. Selen ist in vivo als Effektor an Enzyme gebunden oder
2. Selen ist selbst Bestandteil der aktiven Gruppierung von Enzymen.

1.2.4.2.6. Selen als Effektor von SH-Enzymen

Die erste der beiden Alternativen wurde von Dickson und Tappel verfolgt[50]. Die Autoren untersuchten die thiolabhängige Aktivierung der SH-Enzyme Papain und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. Die Gegenwart von sehr geringen Konzentrationen von Selenocystin beschleunigte die Aktivierung dieser Enzyme durch Disulfid-reduzierende Reagenzien wie Thiole und Borhydrid. Die Enzymaktivität fiel jedoch bald wieder ab, wenn nicht unter anaeroben Bedingungen gearbeitet wurde.

Der erste Teil dieser Ergebnisse wurde als ein durch Selenocystin katalysierter Thiol-Disulfidaustausch zwischen

der inaktiven Disulfidform des Enzyms und dem reduzierenden Thiol interpretiert. Als Initialschritt wurde die Reduktion von Selenocystin durch den Aktivator angenommen. Das entstandene Selenol soll die inaktive Enzymform durch Reduktion zum Thiol-Enzym aktivieren. Im Verlauf der Enzymtätigkeit wird dann das Enzym durch Luftsauerstoff vermutlich wieder inaktiviert. Dabei wird das essentielle Enzym-SH entweder zu höheren Oxidationsprodukten oder, möglicherweise in einer neuen Selenocystinkatalyse, zur Disulfidform oxidiert. Die beiden Reaktionen, in die nach diesen Vorstellungen Selenocystin als Katalysator eingreift, gleichen formal einer Reihe anderer selenkatalysierter Thioloxidationen (vgl. Tabelle 8). Vermutlich unterscheiden sich diese jedoch stark in ihren Reaktionsmechanismen.

Abweichend von den Ergebnissen unter normalen Aktivierungsbedingungen ergaben Wiederholungen der Aktivierungsprozedur keine (oder nur geringe) Verringerung der Gesamtaktivität, wenn neben dem Aktivator Cystein Selenoaminosäuren im Aktivierungsansatz vorhanden waren. Daraus wurde geschlossen, daß sich Selenoaminosäuren an das aktive Enzymthiol anlagern und damit die irreversible Oxidation des Enzyms verhindern. Der sigmoidale Verlauf der Zeit-Umsatz-Kurven bei Anwesenheit von Selenoaminosäuren im Testansatz wurde als Bestätigung dieses labilen Schwefel-Selenkomplexes angesehen, der im Testansatz verzögert durch die Substratbindung verdrängt wird. Die Art der Bindung zwischen Enzym-Thiol und Selenoaminosäure ist ungeklärt. Der Komplex scheint jedoch bei der Dialyse gegen Puffer zu zerfallen.

Die beiden Effekte der Selenoaminosäuren, die Katalyse der Thiolenzym-Aktivierung und der Schutz der aktiven Reaktionszentren, wurden von Dickson und Tappel als Beitrag zur antioxidativen Funktion der Selenoverbindungen im Gewebe gewertet[50]. Dafür spricht, daß die Modelluntersuchungen unter physiologischen Bedingungen durchgeführt wurden. Die Katalyse von Selenocystin bei der Aktivierung von Papain war schon erkennbar, wenn die Konzentration des Katalysators die

des Enzyms nur wenig übertraf. Über die Einflußnahme auf die Enzymkatalyse kann sich die Auswirkung geringer Selenkonzentrationen auf die Vorgänge im Gewebe verstärken. Damit würde auch die Forderung erfüllt sein, daß Selen in seiner Funktion als Antioxidanz in Verbindung mit Proteinen hochwirksam und gleichzeitig spezifisch schützen kann.

Der Disulfidaustausch während der Enzymaktivierung sollte von der Konzentration der Thiole in der Zelle abhängen. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, einen Einfluß von SH-Gruppen auf die Rolle von Selen zu erklären. Hier sei auch erwähnt, daß Barron[11] die Regulation der Zellzyklen als Einfluß wechselnder GSH-Konzentrationen auf reversibel inaktivierte SH-Enzyme ansah, eine Hypothese, die inzwischen widerlegt zu sein scheint[120].

Eine frühere Theorie zur antioxidativen Funktion von Selen ging davon aus, daß disoziiertes Selenocystein als funktionelle Selenspezies anzusehen sei[49]. Da die Reduktion von Selenocystin vom Überschuß an Thiol abhängt, sollte die Funktion von Selen stark vom aktuellen Quotienten zwischen GSH und Selenocystin beeinflußt werden. Ein gewichtiger Einwand trifft jedoch beide hier referierten Vorstellungen. Für die Voraussetzung, daß Selenoaminosäuren oder doch entsprechende niedermolekulare Selenide in hinreichender Konzentration in der Zelle vorliegen, fehlen bisher konkrete Hinweise.

1.2.4.2.7. Selen als Enzymbestandteil in Glutathionperoxidase

Glutathionperoxidase soll nun für den Fall stehen, in dem Selen selbst Bestandteil eines Enzyms ist, das antioxidative Funktionen ausübt.

In den Untersuchungen von Krishnamurty und Bieri[126] bewirkte Selen nur einen kurzfristigen Schutz vor Hämolyse für dialursäurebelastete Erythrocyten. Damit schien diese Funktion allein eine Domäne der Vitamin-E-Wirkung zu sein. Rotruck und Mitarbeiter[196] konnten dagegen nachweisen, daß die Hemmung der Hämolyse durch Selen von der Anwesenheit

von Glucose abhängt. Dieser Effekt war zuvor nicht aufgefallen, weil Vitamin E auch unabhängig von Glucose vor Hämolyse schützte. Aus der Kooperativität von Glucose und Selen schlossen die Autoren auf einen Zusammenhang zwischen Selenwirkung und NADPH-abhängigem Glutathionstoffwechsel in Erythrocyten. Weitere Untersuchungen ergaben[197, 198], daß Hämolysat aus selensupplementierten Rattenerythrocyten die Hämoglobin-Oxidation durch Wasserstoffperoxid oder Askorbat in einer GSH-abhängigen Reaktion hemmten. In Parallelversuchen mit Hämolysat aus dem Blut von Selenmangel-Ratten wurden weder ein Oxidationsschutz noch ein korrelierbarer GSH-Verbrauch festgestellt. Bemerkenswerterweise war in diesen Tieren, wie auch andere Untersuchungen bestätigen[17], der erythrocytäre Glutathion-Spiegel nicht erniedrigt sondern erhöht. Die fehlende Schutzwirkung in defizientem Hämolysat konnte weder durch Selenit noch durch GSH oder Dithiothreit oder durch deren Kombination rekonstruiert werden. Da die Aktivität hitzelabil und nicht dialysierbar war, wurde Glutathionperoxidase als Sitz des funktionellen Selens angenommen. Aus Erythrocyten von Selenit-75-supplementierten Ratten gelang die Anreicherung von GSH-Peroxidase[198, 199]. Ein großer Teil des radioaktiven Selens kochromatographierte mit der Glutathionperoxidase-Aktivität an DEAE-Sephadex. Die Gelfiltration an Sephadex G 150 zeigte anschließend einen radioaktiven Peak mit GSH-Peroxidase-Aktivität und etwa 90 000 Molekulargewicht. Auf Grund ihrer Ergebnisse betrachteten Rotruck und Mitarbeiter Selen nicht als locker gebundenen Kofaktor, sondern als integralen Bestandteil von Glutathionperoxidase.

Zusammen mit diesen Ergebnissen deutet die Kongruenz der antioxidativen Wirkungen von Glutathionperoxidase und supplementiertem Selen auf eine Beteiligung des Spurenelements am katalytischen Geschehen. Ob Glutathionperoxidase definitiv als Selenoenzym eingestuft werden kann, läßt sich jedoch nur durch Untersuchungen an isoliertem Enzym treffen.

Angeregt durch die Berichte von Rotruck und Mitarbeitern[198], gelang es uns, den Selengehalt hochgereinigter Glutathionperoxidase aus Rinderblut zu bestimmen[75]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 4 Grammatome Selen pro Mol Enzym festgestellt vgl. 3.8.1.). Dieses Ergebnis wurde inzwischen von Hoekstra und Mitarbeitern[107] an GSH-Peroxidase aus Lammblut bestätigt.

1.3. Ziele der vorliegenden Arbeit

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden an hochgereinigter Glutathionperoxidase aus Rindererythrocyten durchgeführt. Einerseits sollten die Informationen über die Reaktionsweise und den katalytisch aktiven Bereich des Enzyms erweitert werden, wobei die enzymatische Aktivität als Meßgröße verwendet wurde. Andererseits galt es, mit der Analyse des Aminosäure- und Selen-Gehalts weitere Anhaltspunkte zum Molekülaufbau von GSH-Peroxidase zu erbringen.

Aus den Ergebnissen kinetischer Untersuchungen ergeben sich die bisher wichtigsten Grundlagen für die Interpretation des Reaktionsverhaltens von Glutathionperoxidase[73, 76]. Es schien deshalb notwendig, die kinetischen Versuchsergebnisse durch weitere Untersuchungen auf diesem Sektor zu stützen und zu ergänzen. Die Beziehung zwischen GSH-Peroxidase und seinem Akzeptorsubstrat sollte sich im kinetischen Verhalten des Enzyms mit verschiedenartigen Hydroperoxiden verdeutlichen lassen. Die Wechselwirkung zwischen Enzym und Donorsubstrat schien sich in der pH-Abhängigkeit der enzymatischen Umsatzraten zu zeigen. Diese Abhängigkeit wurde deshalb für zwei sehr unterschiedliche Donor-Thiole, GSH und Mercaptoessigsäuremethylester, unter Akzeptorsubstrat-Sättigung untersucht. Wie sich eine pH-Verschiebung zwischen pH 6,7 und pH 7,7 auf die kinetischen Konstanten auswirkt, sollte in einer Meßreihe überprüft werden, die mit früheren kinetischen Untersuchungen[140] verglichen werden konnte.

Weitere Hinweise auf die an der Enzymreaktion beteiligten Gruppen wurden von Hemmversuchen erwartet. Das bisher bekannte Hemmverhalten von Glutathionperoxidase wurde als Argument für eine Beteiligung von Thiolgruppen an der enzymatischen Katalyse verwendet[69]. Trotzdem blieb die Wirkung von SH-Reagenzien auf Glutathionperoxidase nicht ohne Widersprüche. Die früheren Befunde sollten deshalb durch weitere Hemmversuche mit gruppenspezifischen Modifizierungsreagenzien erweitert werden. Modifizierungsreaktionen mit starkem Einfluß auf die Enzymaktivität sollten durch Veränderung der Inkubationsbedingungen näher charakterisiert

werden. Da sich Jodacetat in Vorversuchen als besonders effektiver und selektiver Inhibitor von GSH-Peroxidase erwiesen hatte, ergab sich die Möglichkeit, über dessen selektive Hemmwirkung

1. einen zusätzlichen Beweis für die Existenz zweier Enzymformen zu erbringen und
2. die Anzahl der reaktiven Zentren des Enzymmoleküls zu bestimmen.

Durch die Analyse der Aminosäurenzusammensetzung von Glutathionperoxidase sollten die Einzelbestandteile des Enzymproteins quantifiziert werden. Tryptophan wurde zusätzlich photometrisch bestimmt. Eine Aminosäure-Analyse nach Perameisensäure-Vorbehandlung galt besonders dem Cysteingehalt des Enzyms.

Angeregt durch die Untersuchungen von Rotruck et al.[198], sollte der Selengehalt in hochgereinigter Glutathionperoxidase aus Rinderblut gesichert und quantifiziert werden. Als analytische Methode bot sich die Neutronenaktivierung mit anschließender quantitativer Auswertung des γ-Spektrums an. In den schon früher mit p-Toluolsulfonsäure hydrolysierten Enzymproben sollte weiter die Verteilung von Selen nach ionenaustausch-chromatographischer Auftrennung festgestellt und mit dem Elutionsverhalten analog behandelter Selenoaminosäuren verglichen werden.

Abschließend soll in der Diskussion dieser Untersuchungen versucht werden, die bekannten Befunde zum Reaktionsverhalten von GSH-Peroxidase zusammenfassen und die Möglichkeit einer Beteiligung von Selen am Reaktionsmechanismus zu umreißen. Ferner soll der Zusammenhang zwischen Selengehalt und Glutathionperoxidase-Aktivität in verschiedenen Geweben kritisch beleuchtet werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Verwendete Geräte

Zentrifugen: "Mistral" von MSE; "Servall-Superspeed" von Sorvall, Norwalk, Conn., USA;

Fraktionssammler: "Linear II" von Serva, Heidelberg; "Ultro-Rac" von LKB Produkter, Stockholm, Schweden;

Photometer: "Eppendorf" mit Schreiber und thermostatisierbarem Küvettenhalter von Netheler und Hinz, Hamburg; "PMQ II" von Zeiss, Oberkochen; "DB-GT" von Beckman, München; "Unicam SP 1800" von Phillips;

pH-Meter: "pH 26" von Radiometer, Kopenhagen, Dänemark; Präzisions-pH-Meter von Knick, Berlin; Einstab-Glaselektroden von Ingold, Berlin;

Leitfähigkeitsmeßgerät von WTW, Weilheim;

Polarograph: "P04" von Radiometer, Kopenhagen, Dänemark;

Projektor: "Prado" von Leitz, Wetzlar;

Thermostaten und "Ultra"-Kyrostat von Colora, Lorch;

Aminosäure-Autoanalyzer: "Unichrom" von Beckman, München;

Rotationsverdampfer von Büchi, Flawil, Schweiz;

Chromatographierohre von Quickfit, Wiesbaden;

"Quenching-Type-Rapid-Flow-Apparat": siehe l. c.[73, 140];

"Eppendorf"-Pipetten von Netheler und Hinz, Hamburg.

2.2. Verwendete Substanzen

Chromatographiematerial: Sephadex G 150, G 100, G 50 coarse, G 25 fine und DEAE-Sephadex A 50 von Pharmacia, Uppsala, Schweden;

Akzeptorsubstrate: Äthylhydroperoxid von Ferrosan, Malmö, Schweden; Cumolhydroperoxid und tert.-Butylhydroperoxid von den Elektrochemischen Werken München; Perhydrol von Merck, Darmstadt.

Donorsubstrate (und Analoge): GSH von den Zellstoffwerken Waldhof Aschaffenburg;
folgende Substanzen wurden mir dankenswerterweise zur Verfügung gestellt: γ-L-Glutamyl-L-cysteinylmethylester, N-Acetyl-L-cysteinmethylester und Ophthalmsäure von Herrn Dr.E.Schaich, Mercaptoessigsäuremethylester und Asparthion von Herrn Doz. Dr. G. Jung und L-Cysteinylglycin von Herrn Prof.Dr.F.Schneider.

Modifizierungsreagenzien: Phenylglyoxal, Bengalrosa und 4,4'-Dithiodipyridin von Fluka, Buchs, Schweiz; β-Propiolacton von Schuchardt, München; Jodacetat, 5-Amino-1H-tetrazol und Imidazol von Merck, Darmstadt; N-Äthylmaleinimid, p-Chlormercuribenzoat, 2-Hydroxy-5-nitrobenzylbromid, 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoat), Jodacetamid und Tetranitromethan von Serva, Heidelberg.

Puffer: N-Morpholino-3-propansulfonsäure, Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoäthansulfonsäure und 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol von Serva, Heidelberg.

Für den gekoppelten Test: Glutathion-Reduktase aus Hefe und Nicotin-amid-Adenin-Dinucleotidphosphat, reduziert, von Boehringer, Mannheim; oxidiertes Glutathion von Serva, Heidelberg.

Standard- und Modellsubstanzen: Rinderserumalbumin von Serva, Heidelberg; Cytochrom c (Pferd) und Ribonuklease A (Rind) von Boehringer, Mannheim; Tryptamin x HCl von Serva, Heidelberg; Selenocystin und Selenomethionin (grade A) von Calbiochem, San Diego, USA.

Alle ungenannten Reagenzien waren p.A. Substanzen von Merck, Darmstadt.

Abkürzungen:

BIS/Ac: 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol (eingestellt mit Essigsäure)
DTDP : 4,4'-Dithiodipyridin
DTNB : 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoat), Ellman's Reagenz
EDTA : Äthylendiamintetraacetat
GSH : reduziertes Glutathion
GSSG : oxidiertes Glutathion
JAA : Jodacetamid
JAc : Jodacetat
MOPS : N-Morpholino-3-propansulfonsäure
$NADP^+$: oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
NADPH : reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
NEM : N-Äthylmaleinimid
pCMB : p-Chlormercuribenzoat
TES : Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoäthansulfonsäure
TNM : Tetranitromethan

2.3. Methoden

2.3.1. Zur Isolierung und Kristallisation von GSH-Peroxidase aus Rinderblut

Die Reindarstellung von Glutathionperoxidase aus Rindererythrocyten folgte weitgehend dem Präparationsschema von Flohé et al.[67]. Der Präparationsgang ist, in 8 Stufen gegliedert, aus Schema 1 ersichtlich.

Eine typische Präparation ging von 40 l Rinder-Citratblut aus und ergab nach 6-8 Wochen zwischen 20 und 30 mg hochgereinigte GSH-Peroxidase. Die Entsalzung von stromafreiem Hämolysat (Stufe 2) erfolgte in Ansätzen zu je 8 l an 70 l Sephadex G 50 coarse (Säule 28 x 150 cm). Das hochmolekulare Material dieser Trennung, 3-4 mal ca. 20 l, wurde auf ca. 20 l DEAE-Sephadex A 50 aufgetragen (Säule 28 x 60 cm). Ausgehend von 500 g trockenem Austauscher war das Gel zuvor sorgfältig mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 unter Kontrolle der Puffer-Leitfähigkeit äquilibriert worden. Das Eluat der Austauschersäule (Stufe 4), 20 - 30 l, wurde mit

GSH versetzt (ca. 0,2 mM) und im Tiefkühlraum durch Abschöpfen frisch gebildeten Eises auf etwa 4 l eingeengt. In das mit 4 M Kaliumphosphatpuffer (je 2 M primäres und sekundäres Kaliumphosphat) abgefällte Konzentrat wurden etwa 100 ml Cellit eingerührt. Nach Absitzen des Niederschlages konnte der klare Überstand abgehebert werden. Gemeinsam mit dem Cellit wurde der Niederschlag in eine Säule (4 x 20 cm) überführt und durch Eluieren mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer gelöst. In der Gelchromatographie an 10 l Sephadex G 150 (Säule 10 x 150 cm; Auftragevolumen ca. 150 ml) wurde GSH-Peroxidase kurz vor Hämoglobin eluiert. Bei hoher Viskosität der aufzutragenden Proteinlösung ergab Chromatographie an Sephadex G 100 teilweise bessere Resultate. Die spezifische Aktivität der angereicherten GSH-Peroxidase (Stufe 5) entschied, ob ein zusätzlicher Reinigungsschritt an DEAE-Sephadex der Chromatographie an Hydroxylapatit vorgeschaltet werden sollte. Hydroxylapatit wurde nach Tiselius et al.[251] präpariert.

Zur Adsorption an Hydroxylapatit mußte die Phosphatkonzentration der Proteinlösung unter 1o mM gesenkt werden. Die Säule wurde bei gleichmäßigem Durchfluß mit leicht konkavem Gradienten eluiert. Fraktionen ungenügender spezifischer Aktivität wurden erneut den beschriebenen Reinigungsverfahren unterworfen.

Schema 1: Zur Isolierung von Glutathionperoxidase aus Rinderblut

<u>Ausgangsmaterial</u>: Rinderblut mit Citrat (2 l 3,8% Citratlösung / 10 l)

a) Serum abzentrifugiert
b) 4 mal mit o,9% NaCl-Lösung gewaschen

1. <u>Gewaschene Erythrocyten</u>

a) 1 Stunde mit 1/2 Vol. Wasser und 1/4 Vol. CCl_4 geschüttelt
b) zentrifugiert, filtriert

2. Stromafreies Hämolysat (GSH-Peroxidase-Aktivität ca. 0,04 U_{37}/ mg)
   Entsalzung durch Gelfiltration (Sephadex G 50 coarse)

3. Hochmolekulares Material niederer Ionenstärke (5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7)
   a) Adsorption an DEAE-Sephadex A 50, gewaschen mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 (ca. 1 Säulenvolumen)
   b) Elution mit 70 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0

4. Proteinfraktion mit verringertem Gehalt an Hämoglobin und Katalase
   a) konzentriert durch Ausfrieren
   b) gefällt mit 4 M Kaliumphosphat (Endkonzentration 2,5 M)
   c) Niederschlag über Cellit filtriert, gelöst
   d) Gelchromatographie an Sephadex G 150

5. Angereicherte GSH-Peroxidase (ca. 200 U_{37}/ mg) wahlweise oder kombiniert:
   a) Adsorption an DEAE-Sephadex A 50, Gradientenelution: linear, 5 - 70 mM Kaliumphosphatpuffer
   b) Adsorption an Hydroxylapatit, Gradientenelution: 5 - 60 mM Kaliumphosphatpuffer

6. Hochgereinigte GSH-Peroxidase ($>$ 400 U_{37}/ mg)
   Fällung mit 4 M Kaliumphosphatpuffer

7. Lagerform von GSH-Peroxidase (monatelang stabil)
   gegebenenfalls Wiederholung der Schritte 4c - 7

8. Kristalline GSH-Peroxidase ($>$ 500 U_{37}/ mg)

GSH-Peroxidase konnte kristallisiert werden, wenn hochgereinigtes, in Kaliumphosphatpuffer abgefälltes Enzym (Stufe 7) partiell gelöst wurde. Der Enzymniederschlag wurde dazu auf Cellit in einer kleinen Säule gesammelt und durch möglichst wenig 5 mM Kaliumphosphatpuffer gelöst. Das Eluat der Cellit-Säule bildete in einem kleinen Reagenzglas einen Phosphatgradienten aus, in dem sich nach wenigen Tagen sichtbar Kri-

stalle zeigten. Die mittlere Phosphatkonzentration der Mutterlauge wurde, nach Fiske und Subba Row[59] analysiert, auf 1,2 M veranschlagt.

2.3.2. Proteinbestimmungen

Zur Proteinbestimmung von Glutathionperoxidase-Lösungen wurden 2 verschiedene Methoden verwendet. Während der ersten Stufen der Enzympräparation wurde Protein nach der Methode von Lowry et al.[141] bestimmt. Die Eichung erfolgte mit Rinderserumalbumin. Im fortgeschrittenen Stadium der Enzympräparation wurde die verlustfreie Proteinbestimmungsmethode nach Warburg und Christian[265] vorgezogen. Die Extinktion bei 280 nm wurde, wie von Flohé et al.[67] an hochgereinigter Glutathionperoxidase geeicht, als $E_{280} = 1.0 = 1,35$ mg GSH-Peroxidase pro ml definiert. Da Glutathionperoxidase, abhängig von ihrem Erhaltungszustand spektrale Veränderungen aufweist, schien es günstiger, zur Methode von Lowry et al.[141] zurückzukehren. Das Volumen des Ansatzes wurde auf 1/5 des vorgeschriebenen herabgesetzt, um weniger Protein einsetzen zu müssen. Die photometrische Bestimmung wurde deshalb in MT 4 Küvetten durchgeführt. Zur Eichung der Methode wurden Lösungen hochgereinigter GSH-Peroxidase-Lösungen bekannter Lowry-Extinktionen zur Gewichtskonstanz im Hochvakuum eingetrocknet und ausgewogen. Der Puffergehalt der Proteinlösungen wurde durch analog behandelte Leerwerte berücksichtigt.

2.3.3. Standard-Aktivitätstest und Berechnung der enzymatischen Einheit von Glutathionperoxidase

Als Standard-Aktivitätstest wurde in dieser Arbeit die "fixed-time-assay"-Methode nach Flohé und Brand[64] (Procedure I) verwandt, bei der die GSH-Konzentration vor und nach einer bestimmten Inkubationszeit am abgestoppten Reaktionsansatz polarographisch analysiert wird. Auf die Prinzipien und Besonderheiten des Verfahrens wurde schon hingewiesen (siehe 1.1.3.2.). Die Zusammensetzung des Test-Ansatzes und der Bezugswerte ist in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2: Ansatz zum Standard-Aktivitätstest von Glutathionperoxidase

A Test-Wert $[GSH]_t$ = x%	B Leerwert $[GSH]_{t=0}$ = 100%	C Null-Wert [GSH] = 0%	D Spontanoxidation
500 µl 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0;1mM EDTA	wie A	wie A	wie A
500 µl Enzymlösung (bei 1 Min Ink.: ≧0,5 U/ml, ≦3 U/ml)	500 µl H_2O bzw. Enzympuffer	wie B	wie B
500 µl 4 mM GSH	wie A	500 µl H_2O	wie A
10 Min Präinkubation (37°C)	wie A	nicht notwendig	wie A
500 µl 5 mM H_2O_2 (37°C; Start!)	1000 µl $HClO_4$ 1,18 M	wie A	wie A
Inkubation bei 37°C t ≧ 10 sec ≦ 2 Min	nicht notwendig	nicht notwendig	wie A
1000 µl 1,18 M $HClO_4$ (Stop!)	500 µl H_2O_2 5 mM	wie A	wie A
1000 µl 1,18 M $HClO_4$	wie A	wie A	wie A

Zu jeder Testserie A gehörte ein Leerwert B . Die Ansätze C und D wurden regelmäßig überprüft. Die spontane GSH-Oxidation in Ansatz D lag unter normalen Verhältnissen bei 8% Umsatz/Minute und wurde nicht berücksichtigt, solange der enzymatische Umsatz sie um mehr als das Dreifache übertraf. Enzymaktivitäten, die weniger als den doppelten Spontanumsatz erzielten, wurden nicht ausgewertet.

Die Proben wurden bei Zimmertemperatur nach 3 Minuten Entgasung mit Stickstoff polarographisch analysiert (tropfende Hg-

Elektrode; Bezugselektrode: $Hg/HgSO_4$/ o,1 M K_2SO_4. Zur Meßmethode siehe l.c.[72]). Die Polarogramme wurden zwischen o und - o,4 V registriert. Die GSH-Konzentrationen wurden als Funktionen der Grenzströme (G) bei - o,3 V ermittelt und auf die maximale Grenzstromdifferenz bezogen:

$$G_B - G_C = [GSH]_{t=o} = 1oo\%\ [GSH]$$
$$G_A - G_C = [GSH]_t = x\%\ [GSH].$$

Die vorläufigen Einheiten U' ergaben sich aus den prozentualen GSH-Konzentrationen wie folgt:

$$lg\ 1oo\%\ [GSH] - lg\ x\%\ [GSH] = U' \text{ pro Ansatz.}$$

Die Einheiten U' wurden auf eine Inkubationszeit von 6o Sekunden normiert und ergaben unter Berücksichtigung der Enzymverdünnung im Reaktionsansatz (2 ml) die Einheiten U_{37} pro ml der eingesetzten Enzymlösung.

2.3.4. Überprüfung der Aktivierbarkeit von GSH-Peroxidase

Aktivierungsstudien dienten einerseits dazu, die Präinkubation im Aktivitätstest zu optimieren und die Brauchbarkeit von Enzymproben zu überprüfen. Andererseits wurde Ophthalmsäure auf eine mögliche Aktivator-Wirkung untersucht.

Im ersten Fall wurde der Standard-Aktivitätsansatz dahingehend modifiziert, daß vortemperiertes GSH zur Enzym-Pufferlösung pipettiert und die Präinkubationszeit bis zum Start der Reaktion durch H_2O_2 zwischen 15 Sekunden und 20 Minuten variiert wurde. Im anderen Fall wurde die Enzym-Pufferlösung, 2 mM an Ophthalmsäure, bis 20 Minuten präinkubiert bevor die Reaktion durch H_2O_2 und GSH, im 10-Sekunden-Abstand pipettiert, wie üblich gestartet wurde.

2.3.5. Ansatz zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit des enzymatischen Umsatzes

Die Ansätze dieser Untersuchung wurden nur zum Teil auf übliche Weise mit Eppendorf-Pipetten pipettiert. Um verfälschungen durch hohe Spontanoxidationsraten von GSH bei erhöhtem pH zu vermeiden, wurde eine Meßserie bei hohen Enzymkon-

zentrationen und den kurzen Inkubationszeiten eines "Quenching-Type-Rapid-Flow-Apparates" durchgeführt (dazu vgl. l.c.[96]).

Im Standard-Aktivitätsansatz wurden o,5 M TES-Puffer bei pH-Werten zwischen 6,39 und 9,23 bzw. BIS/Acetat-Puffer bei pH-Werten zwischen 8,45 und 10,05 (jeweils 2 mM an EDTA) verwendet. Glutathionperoxidase wurde in der handpipettierten Meßserie mit GSH als Donor mit 0,19 U_{37} pro ml Inkubationsansatz und in den Flow-Apparat-Ansätzen[96] mit 2,1 U_{37} pro ml eingesetzt. Mit Mercaptoessigsäuremethylester als Donor wurden 4,1 U_{37}/ml im Reaktionsgemisch verwendet. Die Donorsubstrate wurden jeweils 1 mM eingesetzt. Die Präinkubationszeit wurde bei pH-Werten über 8 auf 5 Minuten und bei Werten über pH 9 auf 3 Minuten verkürzt. Die Inkubationszeiten variierten bei der handpipettierten Meßserie mit GSH als Donor zwischen 10 und 120 Sekunden. Die Reaktionszeit im Flow-Apparat betrug 0,55 Sekunden. Die Ansätze mit Mercaptoessigsäuremethylester wurden zwischen 10 und 120 Sekunden inkubiert.

Die enzymatischen und spontanen Umsatzraten wurden als Δ lg [RSH] Min. bestimmt. Die enzymatischen Umsätze wurden zur Vereinheitlichung der verschiedenen Meßserien auf 1 U_{37}/ml Inkubationsansatz bezogen.

2.3.6. Test der Umsatzraten bei pH 7,7 unter variierten H_2O_2-Konzentrationen

Eine kinetische Studie mit GSH und H_2O_2 als Substraten wurde bei pH 7,7 in o,25 M MOPS-Puffer durchgeführt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden die Bedingungen der kinetischen Untersuchungen von Loschen[140] eingehalten. Zur Kurzzeit-Inkubation wurde wiederum das "Quenching-Type-Rapid-Flow-Gerät" verwendet. Die H_2O_2-Konzentrationen wurden am Schwefelsäure-gequenchten Reaktionsansatz über die Extinktion des Titanyl-Peroxokomplexes bei 405 nm bestimmt (zur Methode vgl. l.c.[140, 73]). Das Akzeptorsubstrat wurde zwischen 2 und o,11 mM im Reaktionsgemisch variiert. Die Auswertung der nach Lee und Wilson[132] korrigierten Umsatzraten erfolgte nach Dalziel[42].

2.3.7. Kontinuierlicher Aktivitätstest in einer kinetischen Studie mit verschiedenen Hydroperoxidsubstraten

In diesen Untersuchungen wurde das gekoppelte Testsystem nach Paglia und Valentine[182] unter Berücksichtigung der Angaben von Flohé und Brand[64] (Procedure II) verwendet. Die Prinzipien dieser Testmethode wurden bereits erörtert (siehe 1.1.3.2.).

Der Testansatz bestand aus:

1500 µl 0,5 M MOPS-Puffer pH 7,0 (2 mM an EDTA)
500 µl GSH 48 bzw. 4,8 mM (auf pH 5,5 titriert)
200 µl GSH-Peroxidase 35 m U_{37}/ml Reaktionsansatz
100 µl GSSG-Reduktase 2,3 U (unter Reaktionsbedingung) / ml Ansatz (kristallisiertes Material aufgelöst und über Sephadex G 25 entsalzt)
100 µl NADPH 7 mM
10 Min. Präinkubation
500 µl Hydroperoxid in bidest H_2O (auf 37°C temperiert)

Der Umsatz wurde bei 37°C in einem Eppendorf-Photometer mit thermostatisiertem Küvettenhalter über die Extinktionsabnahme bei 366 nm registriert. Die Umsatzraten wurden aus jeweils 3 Bestimmungen gemittelt. Der spontane Umsatz wurde vom enzymatischen subtrahiert. Den Berechnungen liegt ein Extinktionskoeffizient von 3,3 cm^2/Mol für NADPH zugrunde.

Zur kinetischen Untersuchung wurden Äthyl-, Cumol- und t-Butyl-Hydroperoxid in Konzentrationen zwischen 3 und 0,02 mM eingesetzt. Die Umsatzraten wurden jeweils bei 8 und 0,8 mM GSH bestimmt. Die graphische Auswertung erfolgte nach Dalziel[42].

2.3.8. Hydroperoxidbestimmung

Die Konzentration von Hydroperoxiden wurde jodometrisch nach Kolthoff und Medalia[127] bestimmt. Ein Aliquot des Hydroperoxids in Eisessig wurde dazu in einem Braunglas-Gefäß 5 Min. mit Stickstoff durchströmt, mit 2 g fein zerriebenem KJ versetzt und 20 Min. bei Zimmertemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Der Inhalt des Gefäßes wurde quantitativ in einen Erlenmeyer-Kolben überführt und mit 0,1 N Thiosulfatlösung titriert.

2.3.9. Ansätze zur modifizierenden Hemmung von GSH-Peroxidase

2.3.9.1. Allgemeine Angaben zur Durchführung der Modifizierungen

Die Modifizierung von Glutathionperoxidase durch verschiedene Reagenzien wurde an der Abnahme ihrer enzymatischen Aktivität gemessen. Dem Modifizierungsansatz wurden deshalb zu bestimmten Zeiten Aliquots entnommen, die im Standard-Aktivitätstest auf ihren enzymatischen Umsatz überprüft wurden. Normalerweise wurde an einer zweiten Enzymprobe die Aktivitätsveränderungen unter Modifizierungsbedingungen ohne Reagenz kontrolliert. Die Abnahme der Enzymaktivität wurde dann an der Aktivität des ersten Kontrollwertes gemessen und in Prozent Restaktivität angegeben.

Glutathionperoxidase wurde im Modifizierungsansatz genügend konzentriert eingesetzt, um die entnommenen Volumina so klein zu halten, daß

1. durch ihre Verdünnung im Standard-Aktivitätstestansatz die Modifizierung unterbrochen wurde und
2. die Beeinflussung der Standard-Testbedingungen durch das Aliquot vernachlässigbar waren.

Als weitere Bedingung mußten die Aliquots stets soviel enzymatische Restaktivität enthalten, daß die spontanen Umsatzraten im polarographischen Test nicht ins Gewicht fielen.

In einigen Modifizierungsansätzen wurde GSH-Peroxidase zunächst mit GSH vorinkubiert. Thiol-Reagenzien mußten in diesen Fällen im Überschuß eingesetzt werden. Der Überschuß an Reagenz wurde in diesen Fällen meist der effektiven Konzentration gleichgesetzt.

Falls nicht anders angegeben, wurden die Modifizierungen bei $37^{\circ}C$ durchgeführt.

Die erste Überprüfung folgender Modifizierungsreagenzien richtete sich nach dem vorstehend umrissenen Testprinzip: Phenylglyoxal, 2-Hydroxy-5-nitrobenzylbromid, β-Propiolacton, N-Äthylmaleinimid, Jodacetamid, p-Chlormercuribenzoat, 4,4'-Dithiodipyridin, 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoat), Tetranitromethan und Jodacetat.

Die Herstellung von 5-Diazo-1H-tetrazol, die Anwendung der Photooxidation und die spezielleren Modifizierungsansätze von Tetranitromethan und Jodacetat sollen näher beschrieben werden.

2.3.9.2. Diazotierung von 5-Amino-1H-tetrazol

0,5 mMol des Amins wurden in 10 ml 0,1 N Schwefelsäure gelöst und im Eisbad langsam mit 5 ml einer 0,1 N Schwefelsäure versetzt, in der 0,5 mMol $NaNO_2$ gelöst waren. Die saure Diazoniumsulfat-Lösung wurde auf 30 mM veranschlagt in den Modifizierungsansatz eingesetzt. Dem Puffer des Standard-Aktivitätstestansatz wurden 0,1 ml einer 4 mM Imidazollösung zugesetzt, um nicht umgesetztes Reagenz rasch zu entfernen.

2.3.9.3. Photooxidation mit Hilfe von Bengalrosa

Die Photooxidation wurde in einer 1 cm Glasküvette durchgeführt, die in einem thermostatisierten Küvettenhalter in definierter Entfernung zu einem Dia-Projektor mit 500 W-Birne als Lichtquelle aufgestellt war. Der Küvetteninhalt wurde während des Versuchs durch einen teflonbeschichteten Magnetrührkern durchmischt. Die Ausgangsaktivität wurde durch eine Probe vor Einschalten der Lichtquelle kontrolliert. Die entnommenen Aliquots wurden bei Rotlicht im Standard-Aktivitätsansatz getestet. Bei den Voruntersuchungen und der Überprüfung der pH-Abhängigkeit der photooxidativen Inaktivierung wurde bei 21°C bestrahlt; der Modifizierungsansatz enthielt 0,001% Bengalrosa. Bei der Versuchsreihe, die den Einfluß der Photooxidation auf verschiedene Donorsubstrate überprüfte, wurde 0,01% Bengalrosa im Ansatz verwendet und bei 37°C bestrahlt. Entsprechend der Reaktivität der verschiedenen Donorsubstrate wurden bei konstanter Enzymkonzentra-

tion im Bestrahlungsansatz zwischen 10 und 100 µl als Aliquots im Standardaktivitätstest eingesetzt.

2.3.9.4. Modifizierungsansätze mit Tetranitromethan

Tetranitromethan wurde in 50% Äthanol gelöst. Wie der Modifizierungsansatz enthielt der Kontrollansatz 10% Äthanol. Die pH-Abhängigkeit der Hemmung durch TNM wurde zum Teil in Modifizierungsansätzen gemessen, in denen GSH aus der Vorinkubation durch einen Überschuß an Jodacetamid beseitigt war. 5 Minuten nach der Zugabe von Jodacetamid wurde die Modifizierung durch Tetranitromethan gestartet. Der Kontrollansatz wurde analog behandelt, doch statt mit TNM mit Äthanol versetzt.

2.3.9.5. Isolierung des Produkts aus Jodacetat und GSH

74 mg Jodacetat und 124 mg GSH wurden in Wasser gelöst und neutralisiert. Das Reaktionsgemisch wurde nach einigen Stunden auf eine Anionenaustauschersäule gegeben, die mit 4 M Ameisensäure eluiert wurde. Eine Fraktion, die durch Entfärbung von Jodazid-Reagenz 2-wertigen Schwefel enthalten sollte, wurde mehrfach zur Trockene eingeengt, mit Aceton/Äthanol gefällt und mit Äther gewaschen. Das Produkt erwies sich als stark sauer, reagierte nicht mit Ellmann's Reagenz oder Silbernitrat und wurde im gekoppelten GSH-Peroxidase-Aktivitätstest nur geringfügig umgesetzt. Das Polarogramm einer etwa 0,4 mM Lösung zeigte keine Stufe bei - 0,3 V und eine kleine Stufe im Bereich der GSSG-Redoxstufe.

2.3.9.6. Zu den Modifizierungsansätzen mit Jodacetat

Umkristallisiertes Jodacetat wurde stets vor Gebrauch frisch gelöst und vor Licht geschützt. Die Vorversuche und die pH-Abhängigkeitsstudie der Inaktivierung verwendeten 0,5 mM GSH zur Vorinkubation im Modifizierungsansatz.

Zur Spezifizierung der Hemmwirkung von Jodacetat an GSH-behandelter Glutathionperoxidase wurde der Modifikation mit dieser Reagenzienkombination eine weitere Stufe mit GSH

und Jodacetamid vorgeschaltet. Ausgehend von einer GSH-Konzentration von 0,5 mM im Modifizierungsansatz, wurde GSH nach 35 Minuten durch die doppelte Menge Jodacetamid beseitigt. Dieses Reagenz wurde seinerseits nach weiteren 15 Minuten durch die gleiche Menge von GSH inaktiviert, worauf nach 2 Minuten wiederum mit der gleichen Menge Jodacetat die Modifizierung eingeleitet wurde. Da quantitativer Umsatz zwischen GSH und den Alkylierungsreagenzien angenommen wurde, sollte die effektive Endkonzentration von Jodacetat bei 0,25 mM liegen. In einem Parallelversuch wurde der Modifizierungsansatz kurz vor dem Jodacetat-Zusatz mit H_2O_2 versetzt (Endkonzentration 1 mM). Als Kontrollen wurden neben einem Ansatz ohne Alkylierungsreagenzien ein Ansatz verwendet, der bis zur zweiten GSH-Zugabe gleich den Modifizierungsansätzen behandelt wurde.

2.3.9.7. Ansatz zur Titration GSH-vorbehandelter Glutathionperoxidase mit t-Butylhydroperoxid

Zur quantitativen Auswertung der antagonistischen Einflüsse von H_2O_2 (bzw. t-Butylhydroperoxid) und Jodacetat auf die Aktivität GSH-vorbehandelter Glutathionperoxidase war es notwendig, den oben beschriebenen Modifizierungsansatz zu verfeinern. 60 Einheiten GSH-Peroxidase (1,5 nMol) wurden zunächst in 0,1 M TES-Puffer pH 7,0 mit 80 nMol GSH behandelt. Nach 10 Minuten wurde das verbliebene GSH und möglicherweise auch unspezifisch reagierende SH-Gruppen des Enzyms durch 320 nMol Jodacetamid alkyliert.

Die niedermolekularen Reagenzien wurden anschließend durch Chromatographie an Sephadex G 25 fine (Säule: 1,2 x 20 cm, äquilibriert mit 0,1 M TES-Puffer pH 7,0) von der Proteinfraktion getrennt. Wegen der Oxidationsempfindlichkeit des vorbehandelten Enzyms wurde bei 4°C chromatographiert und dabei auf Schläuche verzichtet. Die Proteinlösung wurde mit einer Glaskapillare aufgetragen und die Ausflußöffnung der Glassäule so gewählt, daß ohne Regulation eine vertretbare Durchflußgeschwindigkeit gegeben war. Die Chromatographie wurde nur über die Tropfenzahl des Eluats kontrolliert. Die Proteinfraktion wurde schnell und ohne zusätzliche Analyse

weiter verarbeitet. Das proteinhaltige Eluat wurde in 12 Ansätze unterteilt, von denen 10 mit steigenden Mengen t-Butylhydroperoxid versetzt wurden. Nach 5 Minuten wurde zu den Ansätzen mit Hydroperoxid und einem weiteren Ansatz Jodacetat pipettiert (Endkonzentration 0,1 mM). Die Veränderung der enzymatischen Aktivität wurde in allen Ansätzen in üblicher Weise verfolgt. Nach etwa 20 Minuten war die maximale Aktivitätsdifferenz zwischen dem Ansatz ohne t-Butylhydroperoxid und den Ansätzen mit hohen Hydroperoxid-Konzentrationen (bzw. dem Kontrollansatz ohne beide Zusätze) erreicht. Die Auswertung erfolgte unter der Annahme, daß GSH-reduzierte Glutathionperoxidase selektiv und vollständig von Jodacetat gehemmt wurde. Die Enzymmenge in den Modifizierungsansätzen wurde über die Aktivität des Kontrollansatzes und die angenommene maximale spezifische Aktivität von 550 U_{37}/mg berechnet.

2.3.10. Zur Hydrolyse und Aminosäurebestimmung von GSH-Peroxidase

2.3.10.1. Hydrolysen mit p-Toluolsulfonsäure und mit HCl

Die Hydrolysen von Glutathionperoxidase wurden mit 3 M p-Toluolsulfonsäure nach der Vorschrift von Liu und Chang[139] durchgeführt. Die Methode, die schonender sein soll, als die übliche Hydrolyse mit 6 N HCl, wurde an Cytochrom c aus Pferdeherz erprobt.

Die lyophilisierten Proteinproben wurden abgewogen und quantitativ in Hydrolyseröhrchen (0,8 x 20 cm) überführt. Definierte Proteinlösungen wurden in die Röhrchen pipettiert und lyophilisiert. Als Hydrolyse-Reagenz diente 3 M p-Toluolsulfonsäure mit 1 mg/ml freier Tryptaminbase (Tryptamin wurde aus seinem Hydrochlorid hergestellt. Die gekühlte, wäßrige Lösung des Hydrochlorids wurde alkalisch gemacht und sofort mit Chloroform extrahiert. Aus der Chloroformphase wurde das Amin nach Waschen und Trocknen kristallisiert.). Das Protein-Lyophilisat in den Hydrolyseröhrchen wurde mit 0,5 - 1 ml Hydrolyse-Reagenz versetzt. Die Flüssigkeit wurde im Kältebad eingefroren. Das Röhrchen wurde daraufhin etwa 12-15 cm

über seinem Boden zu einer Kapillare verengt, im Kältebad stehend 20 Minuten mit einer Pumpe evakuiert und an der Kapillare abgeschmolzen. Die Hydrolyseproben wurden in einem gerührten Ölbad bei 110°C inkubiert. Nach 24,48, 72 oder 96 Stunden wurden die Proben aus dem Bad genommen und, wenn notwendig, kühl gelagert. Der Inhalt der Röhrchen wurde möglichst vollständig in ein Meßkölbchen überführt und mit 1 M NaOH versetzt (doppeltes Volumen der eingesetzten p-Toluolsulfonsäure-Lösung). Die Hydrolyse-Lösung wurde bei Bedarf, besonders nach Lagerung der Proben im Kühlschrank, von einem braunen, flockigen Niederschlag abfiltriert.

Perameisensäure-oxidierte Ribonuklease wurde mit 6 N HCl auf ähnliche Weise hydrolysiert wie die übrigen Proben, nur wurde statt p-Toluolsulfonsäure-Reagenz 1 ml 6 N HCl eingesetzt. Nach der Hydrolyse wurde der Inhalt der Hydrolyseröhrchen mehrfach zur Trockene eingeengt und schließlich mit einem definierten Volumen Natriumcitratpuffer aufgenommen.

2.3.10.2. Aminosäureanalyse

Die Aminosäureanalyse eines Aliquots des Hydrolysats erfolgte an einem Beckman Aminosäure-Autoanalyzer. Die lange Austauschersäule (69 x 0,9 cm; Harz: M 72; Füllhöhe: 56 cm) wurde von 0 bis 97 Min. mit 0,2 M Na-Citratpuffer pH 3,26 und von 97 bis 182 Min. mit 0,2 M Na-Citratpuffer pH 4,25 bei 55°C und einer Pufferdurchlaufgeschwindigkeit von 68 ml/h (Ninhydrin: 34 ml/h) eluiert. Die kurze Austauschersäule (23 x 0,9 cm; Harz: M 81; Füllhöhe: 9 cm) wurde unter identischen Bedingungen, jedoch mit 0,35 M Na-Citratpuffer pH 5,88 eluiert. Das Auftragsvolumen (< 1 ml) wurde so gewählt, daß die Mengen der einzelnen Aminosäuren zwischen 15 und 200 nMol lagen.

Die Molmengen der einzelnen Aminosäuren wurden auf die Proteinmenge des analysierten Aliquots bezogen. Materialverluste, vermutlich bedingt durch die geringen Einwaagen und Volumina, zeigten sich in Parallelverschiebungen zwischen den

Aminosäuremengen der verschiedenen Hydrolysat-Aliquots. Die Aminosäuremengen der einzelnen Analysen wurden deshalb über ihren Gehalt an Alanin korrigiert.

2.3.11. Zur Oxidation von GSH-Peroxidase mit Perameisensäure

Die Perameisensäure-Oxidation von Proteinen nach Moore[168] wurde an Rinder-Ribonuklease erprobt und geringfügig modifiziert auf Glutathionperoxidase angewandt.

Das Perameisensäure-Reagenz wurde aus 1 Vol. 30% H_2O_2 und 9 Vol. 88% Ameisensäure im Eisbad hergestellt. Nach 1 Stunde wurden die trockenen Proteinproben mit jeweils 1 ml Reagenz versetzt. Nach 4 Stunden bei 0°C wurde die Oxidation der Ribonuklease-Proben mit 150 µl 48% HBr unterbrochen. Die Proben wurden anschließend mehrfach ($< 40^{\circ}C$) zur Trockene eingeengt und der Hydrolyse mit 6 N HCl unterworfen. Im Falle von Glutathionperoxidase wurde auf den Gebrauch von HBr verzichtet und das Perameisensäure-Reagenz nach 3 Stunden Inkubation im Maschinenvakuum abgezogen (Kühlfalle mit festem NaOH beschickt). Die eingetrockneten Proben wurden mit bidest. H_2O aufgenommen, lyophilisiert und mit p-Toluolsulfonsäurereagenz hydrolysiert.

2.3.12. Photometrische Bestimmung des Tyrosin/Tryptophan-Verhältnisses in Glutathionperoxidase

Der Tyr/Trp-Quotient von frisch isolierter GSH-Peroxidase wurde nach Bencze und Schmid[13] an einem Unicam Spektralphotometer bestimmt. Zunächst wurde das Absorptionsspektrum von nativer Enzymlösung zwischen 240 und 300 nm gegen Leerpuffer registriert (50 ml Kaliumphosphatpuffer pH 7,0; 2 cm MT 4 Quarzküvetten). Danach wurden 1,5 ml der Enzymlösung mit 100 µl 1,6 M NaOH auf pH > 12 eingestellt. Das unmittelbar anschließend gegen analog behandelten Leerpuffer aufgenommene Absorptionsspektrum zwischen 260 und 300 nm (Vorschub: 1 nm/sec) war reproduzierbar und wurde durch Zusatz von weiteren 200 µl 1,6 M NaOH in seiner Form nicht verändert.

Die Auswertung des Absorptionsspektrums bei pH > 12 nach Bencze und Schmid[13] geht von der Steigung der Tangente an

den beiden Maxima und von der Höhe des stärksten Absorptionspeaks aus und ist von den Absolutwerten der Extinktion unabhängig. Der aus diesen Daten berechnete Quotient

$$S = \frac{\Delta E \times 10^3 / \Delta \text{ nm}}{E_{max}}$$ wird mit den S-Werten von

Lösungen definierter Tyr/Trp-Verhältnisse und deren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon \, {}^{1\%}_{1 \text{ cm}}$ verglichen. Die prozentuale Konzentration der Lösung an Tyrosin und Tryptophan errechnet sich nach:

$$c_{Tyr+Trp} = E_{290(1 \text{ cm})} / \varepsilon \, {}^{1\%}_{1 \text{ cm}} .$$

2.3.13. Zur Selenbestimmung durch Neutronenaktivierungsanalyse

Der Selengehalt von nativer GSH-Peroxidase und von einigen Fraktionen des am Aminosäure-Analyzer aufgetrennten sauren Hydrolysats wurden mit Hilfe der Neutronenaktivierungsanalyse bestimmt.

Die Proben wurden zunächst lyophilisiert bzw. eingetrocknet ($< 70^{\circ}C$), in Polyäthylenröhrchen (aus einseitig verschlossenen Polyäthylen-Schlauchstückchen 0,4 x 1,5 cm) eingewogen und eingeschweißt. Die proteinhaltigen Se-Standardlösungen wurden entsprechend behandelt. Die einfachen Se-Standardproben wurden als Lösung in die Röhrchen eingewogen und vor dem Verschließen eingetrocknet ($< 40^{\circ}C$). Die Proben wurden einzeln in hochreine Aluminiumfolie gewickelt und in kleinen Aluminiumkapseln verschlossen.

Die Bestrahlung der Proben erfolgte im Forschungsreaktor 2 der Gesellschaft für Kernforschung, Karlsruhe, über 24 Stunden bei einem Neutronenfluß von 6×10^{13} n/cm^2 x sec. Nach einer Abkühlungsperiode von 10 bis 15 Tagen wurden die γ-Spektren der Proben ohne weitere Vorbehandlung in einem Ge(Li)-Detektor aufgenommen. Der Gehalt der Proben an ^{75}Se ($T_{1/2}$ = 120,4 d) wurde über die Linie bei 264,6 KeV ausgewertet. Der Selengehalt der Einwaage wurde an Hand der Se-Standards quantifiziert.

3. ERGEBNISSE

3.1. Kristallisierte Glutathionperoxidase*

An einer entsprechend hoch konzentrierten Probe hochgereinigter GSH-Peroxidase aus Rindererythrocyten gelang es erstmals, dieses Enzym kristallisiert darzustellen (vgl. 2.3.1.). Abbildung 6 zeigt einige typische Kristalle, von denen die größten in ihrer Längsachse bis zu 0,8 mm maßen. Die farblosen Kristalle erscheinen als flache, rautenförmige Plättchen mit einem spitzen Winkel von 80°, entsprechend einem Achsenverhältnis von 1:0,85. Teilweise sind in Abbildung 6 die abgeschrägten Kanten der Kristallplättchen erkennbar.

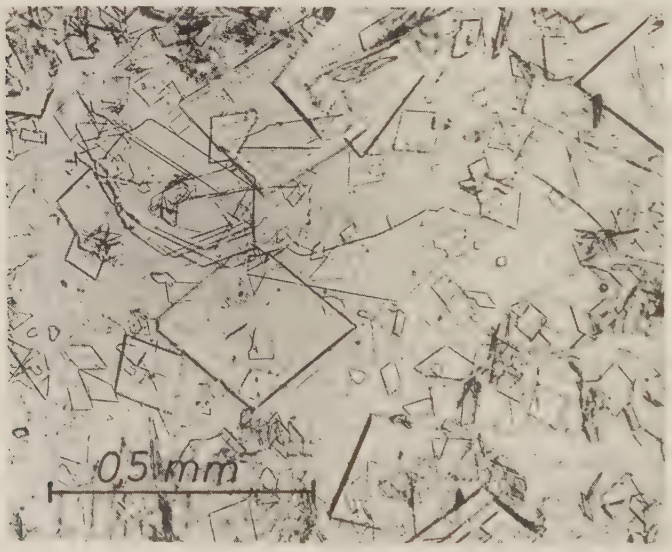


Abb. 6: Kristallisierte Glutathionperoxidase aus Rindererythrocyten.
Für die Mikrophotographie der Kristalle danke ich Herrn Prof.Dr. H. Haselmann (Institut für wissenschaftliche Mikroskopie der Universität Tübingen)

* Das Ergebnis wurde in l.c.[75] veröffentlicht.

Die Kristalle erwiesen sich als sehr zerbrechlich, waren jedoch bei Zimmertemperatur in Mutterlauge längere Zeit stabil. Sie ließen sich in 1,2 M Kaliumphosphatpuffer waschen und lösten sich vollständig in 5 mM Kaliumphosphatpuffer. Die spezifische Aktivität der Lösung lag bei 500-550 U_{37}/mg.

3.2. Eichung der Proteinbestimmung nach Lowry et al.[141] mit hochgereinigter GSH-Peroxidase

Trotz des nicht unerheblichen Materialbedarfs wurde die Proteinbestimmungsmethode nach Lowry et al.[141] auch für hochgereinigte GSH-Peroxidase wieder eingeführt, weil das Enzym mit zunehmendem Alter Veränderungen in seinem Absorptionsbereich um 280 nm zeigt[96], die photometrische Proteinbestimmungen möglicherweise verfälschen können. Es wurde deshalb versucht, die Proteinbestimmung nach Lowry et al.[141] mit hochgereinigter GSH-Peroxidase zu eichen (vgl. 2.3.2.).

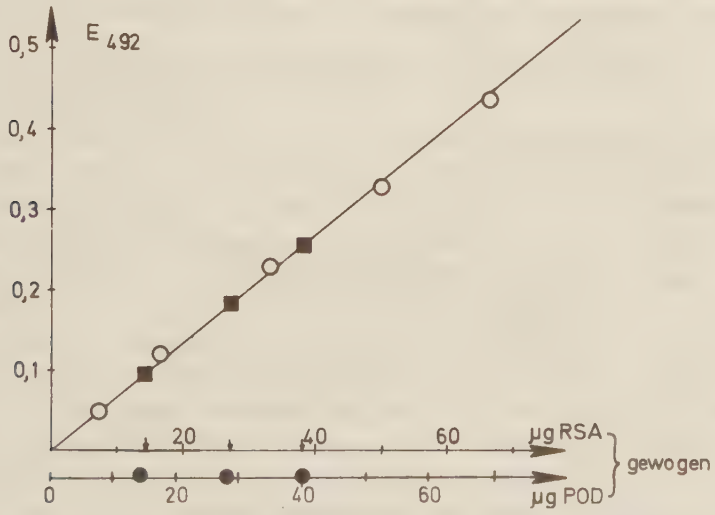


Abb. 7: Eichung der Proteinbestimmung nach Lowry et al.[141] mit Rinderserumalbumin (RSA) und Glutathionperoxidase (POD). ○ Extinktionswerte der Aliquots einer

eingewogenen Rinderserumalbumin-Lösung. □ Extinktionswerte der Aliquots von Glutathionperoxidase-Lösungen. Die Pfeile zeigen die äquivalente Menge RSA an. ● Gehalt der GSH-Peroxidase-Aliquots berechnet nach Trocknen und Auswiegen der entsprechenden Enzymlösungen.

Abbildung 7 ordnet den Extinktionswerten bei 492 nm die äquivalenten Mengen an Rinderserumalbumin und an Glutathionperoxidase pro Ansatz zu. GSH-Peroxidase entwickelt danach nur 95% der Extinktion der gleichen µg-Menge Rinderserumalbumin. Durch Verringern des Ansatzvolumens auf 1/5 der Vorschrift werden pro Analyse etwa 20 µg Protein verbraucht.

3.3. Überprüfung der Aktivierbarkeit von GSH-Peroxidase

Abbildung 8 zeigt an einem typischen Beispiel, daß die im Standard-Aktivitätstest vorgesehene 1o-minütige Präinkubation unter den gegebenen Bedingungen ausreicht, um auch stark aktivierbare Enzymproben auf praktisch maximale Aktivität zu bringen.

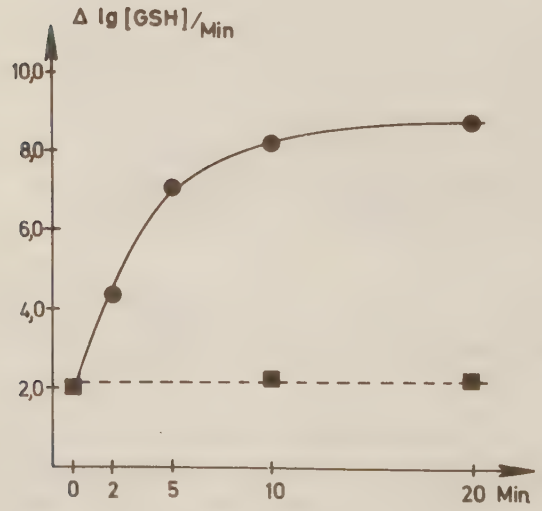


Abb.: 8

Abb. 8: Beeinflussung der Aktivität von Glutathionperoxidase durch Präinkubation mit GSH oder Ophthalmsäure.
● Aktivität nach Präinkubation mit 1,3 mM GSH.
■ Aktivität nach Präinkubation mit 2 mM Ophthalmsäure; Test mit GSH; 60 sec Inkubation.

Der molekulare Zustand der aktivierbaren GSH-Peroxidase ist jedoch nicht hinreichend definiert, um ein gegenüber nicht aktivierbaren Enzymproben verändertes Reaktionsverhalten ausschließen zu können. Die Aktivierbarkeit der verwendeten GSH-Peroxidase-Lösungen wurde deshalb routinemäßig überprüft. Nach Möglichkeit wurden Enzymproben verwendet, die noch keine erkennbare Aktivierbarkeit zeigten.

Es wurde vermutet, daß die Aktivierung von GSH-Peroxidase weniger vom spezifischen Bau des Aktivators GSH abhängt, sondern möglicherweise eine Funktion der RS^--Konzentration sein könnte[96]. Als weiteres Indiz für diese Annahme kann gewertet werden, daß Ophthalmsäure GSH-Peroxidase offenbar nicht aktiviert (vgl. Abb. 8).

3.4. Enzymkinetische Untersuchungen mit verschiedenen Hydroperoxiden*

Das kinetische Verhalten von GSH-Peroxidase aus Rindererythrocyten mit H_2O_2 als Akzeptorsubstrat wurde von Flohé und Mitarbeitern[73] untersucht und im Sinne einer Ter-Uni-Ping-Pong-Reaktionsfolge[38] interpretiert. Diese Untersuchungen hatten größere meßtechnische und prinzipielle Schwierigkeiten zu überwinden (vgl. 1.1.3.2.). Geringe, aber mechanistisch möglicherweise bedeutsame Abweichungen von der Linearität oder Parallelität der Abhängigkeitsbeziehungen im Dalziel-Diagramm konnten nicht ausgeschlossen werden. An Glutathionperoxidase aus Schweineblut hatten Little et al.[137] zudem mit Cumolhydroperoxid als Akzeptor Abweichungen vom normalen enzymkinetischen Reaktionsverhalten beobachtet und als Hinweis auf eine

*Die Ergebnisse wurden in l.c.[97] veröffentlicht.

mögliche allosterische Regulation von GSH-Peroxidase gewertet (vgl. 1.1.3.2.). Es schien deshalb notwendig, kinetische Untersuchungen mit verschiedenen Hydroperoxiden durchzuführen, um einerseits die Beobachtungen von Little et al.[137] an Schweineblut-Glutathionperoxidase und andererseits das mechanistische Konzept von Flohé et al.[73] zu überprüfen.

Die Umsatzgeschwindigkeit der Glutathionperoxidase-Reaktion mit Äthyl-, Cumol- und t-Butylhydroperoxid als variablen Akzeptorsubstraten wurde bei jeweils zwei GSH-Konzentrationen gemessen. Durch die geringere Reaktivität der verwendeten Hydroperoxide und die damit verbundenen geringeren nichtenzymatischen Umsatzraten konnte bei niederen GSH-Peroxidase-Konzentrationen gemessen werden. Damit wurde die Verwendung des kontinuierlichen, gekoppelten Testsystems möglich.

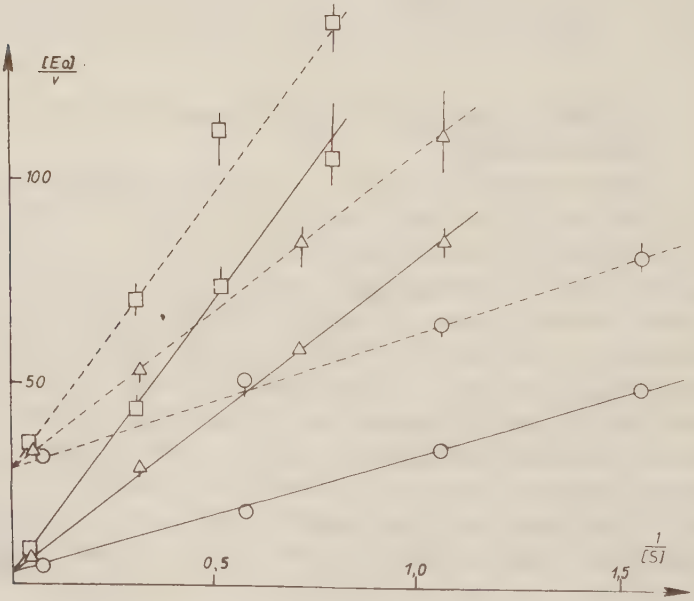


Abb. 9: Dalziel-Diagramm der Glutathionperoxidase-Reaktion mit verschiedenen Hydroperoxiden.

E_o/v ist in 10^{-4}sec und [S] in 10^{-5}M angegeben. Die Messungen wurden in 0,25 M MOPS-Puffer (1 mM EDTA) pH 6,7 bei 37°C durchgeführt. Die Symbole entsprechen den Mittelwerten, die senkrechten Balken den Streuungen der drei Einzelbestimmungen. Akzeptorsubstrate: -○- Äthylhydroperoxid; -△- Cumolhydroperoxid; -□- t-Butylhydroperoxid. Die unterbrochenen Linien markieren Meßserien bei 0,8 mM GSH, die ausgezogenen Linien Meßserien bei 8 mM GSH.

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 9 nach Dalziel[42] aufgetragen. Für alle Abhängigkeitsbeziehungen wurden im Diagramm Geraden erhalten. Bei gegebener GSH-Konzentration schneiden sich die Geraden für alle drei Hydroperoxide auf der Ordinate. Die Maximalgeschwindigkeit $V^A_{(app)}$ ist damit bei definierter GSH-Konzentration unabhängig von der Struktur des verwendeten Hydroperoxids. Die Maximalgeschwindigkeiten sind der GSH-Konzentration direkt proportional. Die Messungen bei den beiden GSH-Konzentrationen ergaben für jedes Hydroperoxid innerhalb der Fehlerbreite parallele Abhängigkeitsgeraden.

Tabelle 3: Kinetische Konstanten der Glutathionperoxidase-Reaktion (I)

Akzeptor-Substrat	GSH (mM)	$\emptyset_2$ (µMxsec)	$\emptyset_1$ (µMxsec)	k_{+1} ($\mu M^{-1} x sec^{-1}$)
t-Butylhydroperoxid	8	2,20	0,134	7,5
	0,8	2,28	0,136	7,4
Cumolhydroperoxid	8	2,20	0,078	12,8
	0,8	2,28	0,078	12,8
Äthylhydroperoxid	8	2,20	0,030	33,3
	0,8	2,28	0,036	29,4
Wasserstoffperoxid (aus l.c.[75])	10-30	2,2	0,017	59

Diese Ergebnisse entsprechen den Verhältnissen, die an diesem Enzym mit H_2O_2 als Akzeptorsubstrat gefunden wurden. Die kinetischen Daten konnten deshalb in gleicher Weise ausgewertet werden. Der kinetische Koeffizient $\emptyset_2$, der sich aus dem Ordinatenabschnitt des Dalziel-Diagramms berechnet, ist für die drei Hydroperoxide identisch und entspricht auch dem mit H_2O_2 als Akzeptor gefundenen Wert (siehe Tab. 3). $\emptyset_1$ und damit die Geschwindigkeitskonstante k_{+1} der Reaktion zwischen Enzym und Hydroperoxid variiert zwischen H_2O_2 und t-Butylhydroperoxid um eine Größenordnung. Die beobachtete Abstufung: H_2O_2 > Äthyl- > Cumol- > t-Butylhydroperoxid entspricht der Reaktionsneigung dieser Substanzen z.B. in der nichtenzymatischen Thioloxidation. Die Unterschiede in den enzymatischen Umsatzraten mit den verschiedenen Hydroperoxiden sind vermutlich auf deren Reaktionsfähigkeit und kaum auf eine spezifische Wechselwirkung zwischen Enzym und Akzeptorsubstrat zurückzuführen.

3.5. Zur pH-Abhängigkeit der Glutathionperoxidase-Aktivität*

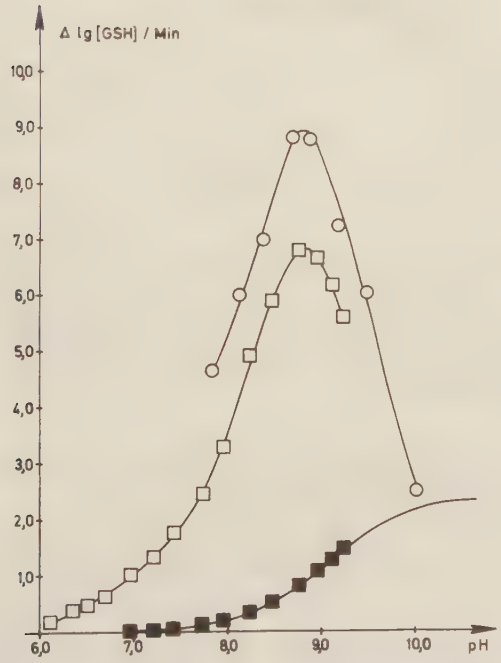
Der steile Anstieg der enzymatischen Umsatzraten mit steigendem pH stützte zunächst die Vermutung, daß das Mercaptid-Anion von GSH als das wirkliche Donorsubstrat von GSH-Peroxidase anzusehen sei[204]. Es zeigte sich jedoch, daß die enzymatische Aktivität um pH 8,8 ein reales Maximum erreicht[96]. Damit mußte angenommen werden, daß mindestens noch eine zweite dissoziable Gruppe die Reaktivität von Glutathionperoxidase beeinflussen kann. Unklar blieb jedoch, ob diese Dissoziationsvorgänge dem Zwitterion GSH oder dissoziablen Gruppen am Enzymmolekül zugeordnet werden sollten. Diese Frage wurde auf zwei Wegen untersucht: Einmal wurde die pH-Abhängigkeit der GSH-Peroxidase-Aktivität mit GSH und mit Mercaptoessigsäuremethylester als Donorsubstraten verglichen. Zum anderen wurde der Einfluß des pH-Werts auf die kinetischen Koeffizienten $\emptyset_1$ und $\emptyset_2$ untersucht.

In seiner Thioldissoziation unterscheidet sich Mercaptoessigsäuremethylester (pK_{SH}= 7,8) besonders deutlich von GSH (pK_{SH}= 9,1)[28]. Trotz dieses Unterschieds erwiesen sich die

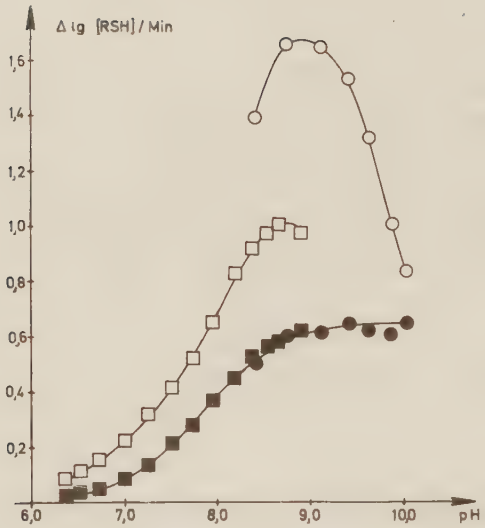
*Die Ergebnisse wurden in l.c.[73] veröffentlicht.

pH-Abhängigkeitskurven der enzymatischen Reaktion für beide Donorsubstrate als annähernd kongruent. Die spontanen Umsatzraten konnten dagegen als Funktionen der Mercaptidionen-Konzentration beschrieben werden (siehe Abb. 10 a, b).

Abb. 10: pH-Abhängigkeit der Glutathionperoxidase-Aktivität
Die Umsatzraten wurden bei 1 mM Anfangs-Substratkonzentration bestimmt. Die Umsatzgeschwindigkeiten wurden als Δlg [RSH] /Min angegeben. Die enzymatischen Umsatzraten sind auf eine einheitliche Enzymkonzentration von 1 U_{37}/ml Ansatz bezogen.



a) Donorsubstrat GSH: -□- TES-Puffer, 0,19 U_{37}/ml; -○-BIS/Acetat-Puffer, 2,1 U_{37}/ml, 0,55 sec Inkubation, Flow-Technik;
■ spontane GSH-Oxidationsrate verbunden durch eine konstruierte Dissoziationskurve mit einem pK von 9,05.



10b)

b) Donorsubstrat Mercaptoessigsäuremethylester: -□- TES-Puffer; 4,1 U_{37}/ml. -○- BIS/Acetat-Puffer, 6,2 U_{37}/ml; ■ , ● spontane Umsatzraten in TES bzw. BIS/Acetatpuffer verbunden durch eine konstruierte Dissoziationskurve mit einem pK von 7,85.

Am gleichartigen, vom Donorsubstrat unabhängigen Anstieg der enzymatischen Aktivität zwischen pH 7 und 8 wird deutlich, daß dem Dissoziationsgrad des Donorthiols nur eine untergeordnete Rolle zukommen kann. Obwohl das Maximum bei pH 8,8 mit Mercaptoessigsäuremethylester als Donor verbreitert erscheint, ist auch in diesem Bereich primär mit effektiven Ladungsveränderungen am Enzymmolekül zu rechnen. Die charakteristische Form des pH-Abhängigkeitsprofils scheint nicht durch Ladungen verursacht zu werden, die einem spezifischen Bindungsmechanismus für GSH zugeordnet werden könnten.

Während bei diesen Untersuchungen H_2O_2 als Akzeptorsubstrat in einem Konzentrationsbereich vorlag, bei dem die ge-

messenen Umsatzraten den Maximalgeschwindigkeiten $V^{A}_{(app)}$ entsprachen, wurde in einer weiteren kinetischen Studie die Akzeptorsubstratabhängigkeit bei pH 7,7 überprüft (siehe Abb. 11).

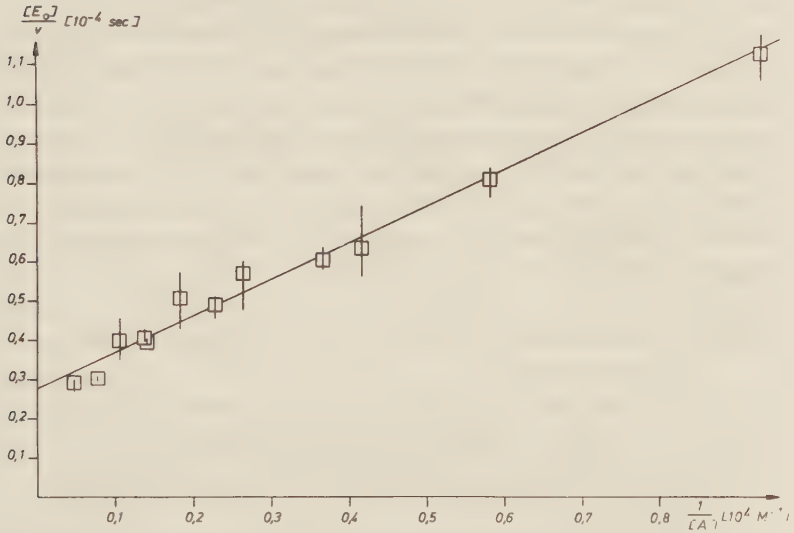


Abb. 11: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von GSH-Peroxidase von der H_2O_2-Konzentration in 0,25 M MOPS-Puffer pH 7,7, aufgetragen nach Dalziel[42].

[A] entspricht der mittleren H_2O_2-Konzentration. v wurde in einem "Quenching-Type-Rapid-Flow-Apparat" aus den Umsatz-Differenzen zwischen zwei verschiedenen Inkubationszeiten errechnet. Die senkrechten Balken geben die Abweichungen der Einzelbestimmungen an.

Die Testbedingungen entsprachen weitgehend einer Meßserie der kinetischen Untersuchung von Flohé et al.[73], die bei pH 6,7 durchgeführt wurde. Die kinetischen Konstanten der beiden Meßserien werden in Tabelle 4 verglichen. Während die Maximalgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion zwischen den beiden pH-Werten um den Faktor 2,7 stieg, erhöhte sich der $K^{A}_{m(app)}$-Wert nur um den Faktor 1,5.

Die Annahme, daß die Glutathionperoxidase-Reaktion einem Ping-Pong-Mechanismus folgen soll, setzt voraus, daß der Reaktionsschritt zwischen Akzeptorsubstrat und Enzymmolekül nicht vom Donorsubstrat beeinflußt werden sollte. Wenn sich, wie in diesem Fall, die Veränderung des pH-Werts nicht nur auf $\emptyset_2$, sondern auch auf die Steigung der Geraden im Dalziel-Diagramm, $\emptyset_1$, auswirkt, muß entweder auf einen veränderten Reaktionsmechanismus oder auf eine wesentliche Veränderung am Enzymmolekül geschlossen werden. Die Auswirkung einer Ladungsveränderung auf k_{+1} könnte angesichts der unspezifischen Reaktion von Enzym und Akzeptorsubstrat als konformationsbedingte Diffusionserleichterung für das Hydroperoxid-Molekül aufgefaßt werden.

Tabelle 4: Kinetische Konstanten der Glutathionperoxidase-Reaktion (II)
(bei 30 mM GSH; mit H_2O_2 als variablem Substrat; in 0,25 M MOPS-Puffer; bei 37°C)

pH	E_o (nM)	$K^A_{m(app)}$ (µM)	$E_o/V^A_{(app)}$ (µsec)	$\emptyset_1$ (nM x sec)	$\emptyset_2$ (µM x sec)
6,7	53,1	226	75	16,8	2,22
7,7	26	339	27,5	9,4	0,83

3.6. Hemmung von GSH-Peroxidase durch gruppenspezifische Reagenzien

Die Untersuchung der aktivitätshemmenden Wirkung von verschiedenen modifizierenden Reagenzien wurde unternommen, um Hinweise auf reaktive Gruppierungen zu erhalten, die am Reaktionsprozeß von Glutathionperoxidase beteiligt sein könnten. Die Untersuchung wurde geplant und durchgeführt, bevor bekannt wurde, daß GSH-Peroxidase Selen gebunden enthält. Die Planung ging von der Hypothese aus, daß Protein-SH-Gruppen an der enzymatischen Reaktion beteiligt sein könnten[60,204,69,137]. Bei den untersuchten Modifizierungsreagenzien handelt es sich

deshalb, mit der Ausnahme von Phenylglyoxal, um Substanzen, die mehr oder weniger bevorzugt mit Thiolgruppen reagieren[158]. Phenylglyoxal und die Photooxidation mit Hilfe von Bengalrosa wurden in das Testprogramm aufgenommen, um möglicherweise positiv geladene Gruppierungen zu erfassen, die für die spezifische Wechselwirkung zwischen Glutathion und dem Enzymmolekül verantwortlich gemacht werden könnten[68].

Auf eine selektive Anwendung dieser Reagenzien wurde zunächst bewußt verzichtet, um weniger effektive Modifikatoren auszusondern. Wegen des spontanen Aktivitätsverlusts von Glutathionperoxidase-Lösungen, besonders bei Abwesenheit von GSH, schien es notwendig, das modifizierende Reagenz in verhältnismäßig hohem (2oo- bis 1ooo-fachem) Überschuß über die Molarität von GSH-Peroxidase einzusetzen und seine Auswirkung auf die enzymatische Aktivität nur über einen kürzeren Zeitraum zu verfolgen. Die Beweiskraft der Hemmversuche wird weiterhin eingeschränkt, weil aus Mangel an Enzymmaterial (entsprechende Untersuchungen hätten gegen 100 mg hochgereinigter GSH-Peroxidase pro Meßserien verbraucht) auf eine molekulare Kontrolle der Modifizierungsreaktion verzichtet werden mußte. Zur Spezifizierung der Hemmwirkung verschiedener Reagenzien wurde deshalb ihre Abhängigkeit von der Vorinkubation der Enzymprobe mit GSH oder vom pH-Wert des Modifizierungsansatzes untersucht.

3.6.1. Überprüfung der Wirkung verschiedener Modifizierungsreagenzien an GSH-Peroxidase mit und ohne GSH-Vorinkubation

Tabelle 5 gibt einen Überblick über den Einfluß der verwendeten Modifizierungsreagenzien auf die Aktivität von Glutathionperoxidase. Die Hemmwirkung der effektivsten Reagenzien wird an Hand der prozentualen Restaktivität in den Abbildungen 12 bis 16 zeitabhängig dargestellt. Unter den Inkubationsbedingungen zeigten die folgenden Reagenzien keinen oder nur geringen Einfluß auf die Enzymaktivität: Phenylglyoxal, 2-Hydroxy-5-nitrobenzylbromid, 5-Diazo-1H-tetrazol, β-Propiolacton, N-Äthylmaleinimid und Jodacetamid. Deutliche Hemmung der Glutathionperoxidase-

Aktivität wurde festgestellt bei Inkubation mit p-Chlormercuribenzoat, 4,4'-Dithiodipyridin, 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoat), Tetranitromethan und durch Photooxidation mit Hilfe von Bengalrosa.

Tabelle 5: Einfluß verschiedener Modifizierungsreagenzien auf die Aktivität von Glutathionperoxidase

Reagenz	effekt. Konz. (mM)	Vorink. (GSH)	pH, Puffer, Konz. (mM)	% Restakt. (nach Min)
Phenylglyoxal	0,8	-	8,3 TES, 100	86 (20)
	0,8	+	8,3 TES, 100	100 (20)
2-Hydroxy-5-nitrobenzylbromid	0,8	-	8,3 TES, 100	90 (20)
	0,4	+	8,3 TES, 100	100 (20)
5-Diazo-1H-tetrazol	0,8	-	8,3 TES, 100	72 (20)
	0,4	+	8,3 TES, 100	100 (20)
ß-Propiolacton	0,8	-	6,4 TES, 100	100 (20)
	0,4	+	6,4 TES, 100	100 (20)
NEM	0,8	-	6,7 TES, 100	100 (20)
	0,4	+	6,7 TES, 100	100 (20)
JAA	0,4	+	8,3 TES, 100	100 (30)
pCMB	0,4	-	8,0 TES, 100	24 (20)
(vgl. Abb. 12)	0,4	+	8,0 TES, 100	46 (20)
DTDP (vgl. Abb. 17)	0,4	-	8,1 MOPS, 40	30 (10)
DTNB	0,4	-	8,0 TES, 100	20 (20)
(vgl. Abb. 13)	0,4	+	8,0 TES, 100	24 (20)
TNM in 50%	0,9	+	7,3 TES, 20	53 (15)
Äthanol	0,9	+	7,9 TES, 20	40 (10)
(vgl. Abb. 14)	0,9	+	8,4 BIS/Ac, 20	25 (10)
Photooxidation	500 W,	-	7,1 MOPS, 10	45 (20)
(vgl. Abb. 15)	80 cm	+	7,1 MOPS, 10	55 (20)
JAc	0,8	-	8,3 TES, 100	100 (20)
(vgl. Abb. 16)	0,8	+	8,3 TES, 100	0 (10)

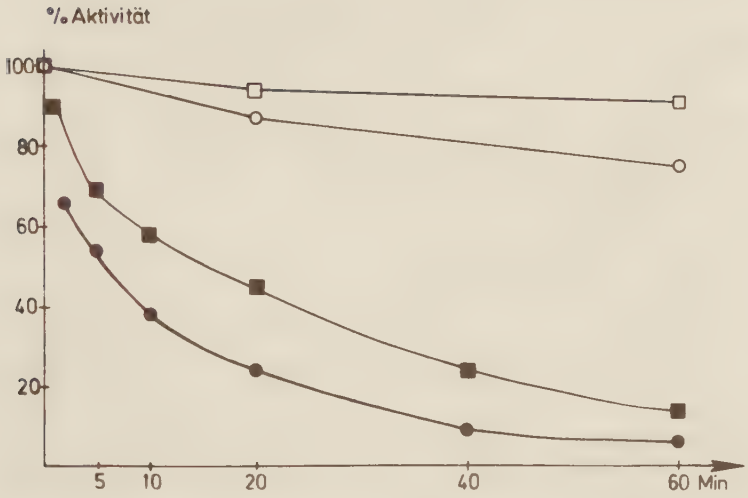


Abb. 12: Hemmung von Glutathionperoxidase durch p-Chlormercuribenzoat mit und ohne Vorbehandlung mit GSH.

Bedingungen siehe Tab. 5.

- Glutathionperoxidase mit GSH vorinkubiert
- nicht vorbehandeltes Enzym
- Kontrolle (ohne Reagenz) mit GSH;
- Kontrolle ohne GSH.

Abb.: 13

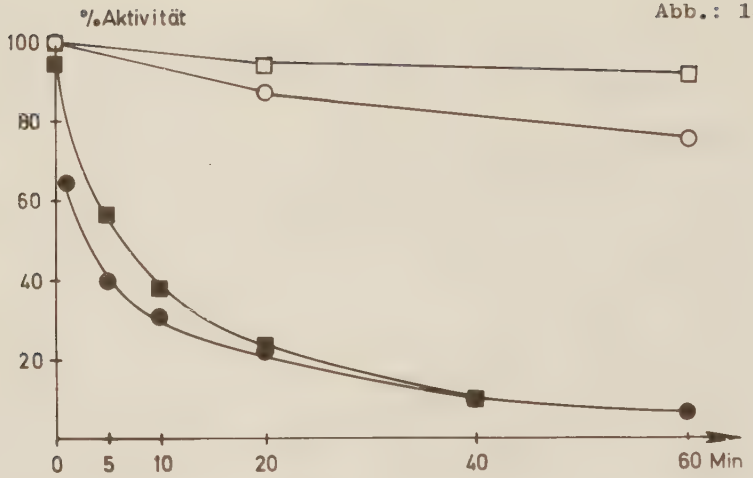


Abb. 13: Hemmung von GSH-Peroxidase durch 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoat) mit und ohne Vorbehandlung durch GSH.
Bedingungen siehe Tab. 5.

Enzymwerte Kontrollwerte

■ □ mit GSH behandelt

● ○ nicht mit GSH behandelt

Abb.: 14

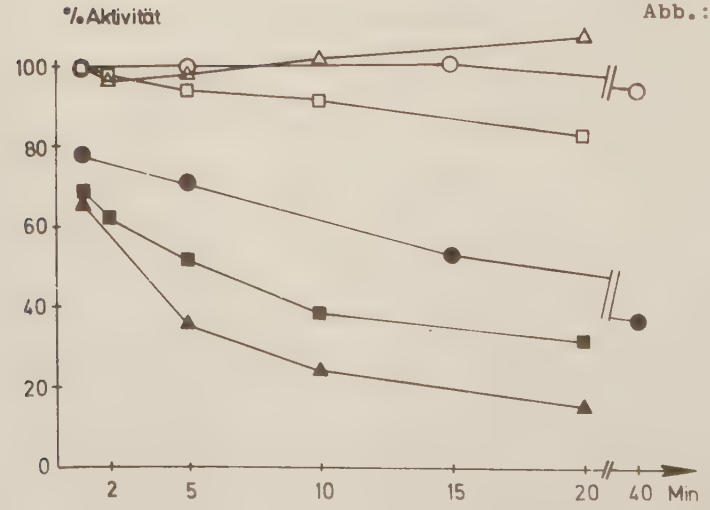


Abb. 14: Hemmung von GSH-vorinkubierter Glutathionperoxidase durch Tetranitromethan bei verschiedenen pH-Werten.

Bedingungen siehe Tab. 5.

mit , ohne Tetranitromethan; Puffer, pH im Modifizierungsansatz

●	○	TES	7,3
■	□	TES	7,9
▲	△	BIS/Acetat	8,4

Abb.: 15

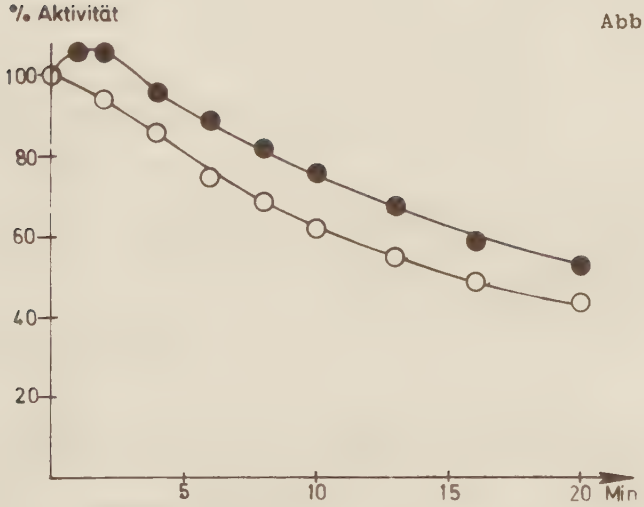


Abb. 15: Hemmung von GSH-Peroxidase durch Photooxidation mit Hilfe von Bengalrosa.

Bedingungen siehe Tab. 5.

Bestrahlungsansatz mit GSH ●

ohne GSH ○

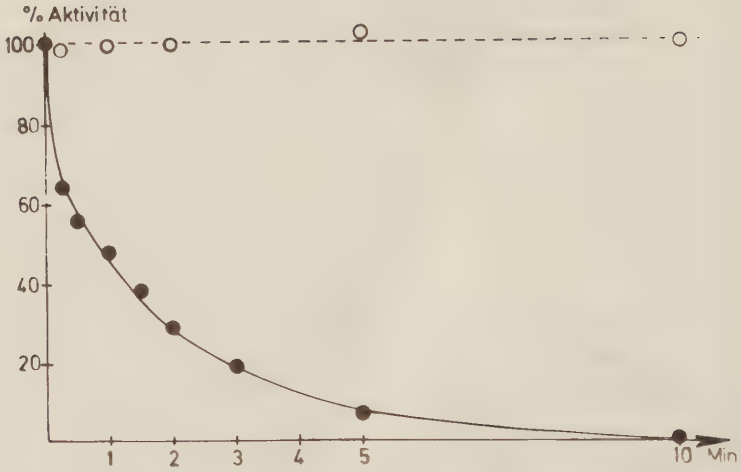


Abb. 16: Inaktivierung von Glutathionperoxidase durch Jodacetat nach Vorbehandlung mit GSH*.
Bedingungen siehe Tab. 5.
—●— mit GSH vorbehandelt
--○-- gleicher Ansatz mit nicht vorbehandeltem Enzym

In einigen Fällen wurde zwischen dem Einfluß der modifizierenden Substanz auf die Aktivität nicht vorbehandelter und mit GSH vorinkubierter Glutathionperoxidase unterschieden. Die bisher erwähnten Modifizierungsreagenzien zeigten nach einer bestimmten Inkubationszeit in den Ansätzen eine etwas niederere Aktivität, in denen das Enzym nicht mit GSH vorbehandelt war. Möglicherweise könnte es sich bei diesem Effekt um eine Stabilisierung des Enzyms durch GSH handeln, wie sie sich auch den Kontrollansätzen in Anwesenheit von Glutathion zeigt. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß die effektive Konzentration der Thiolreagenzien in den Modifizierungsansätzen mit GSH unterschätzt wurde.

* Das Ergebnis wurde in l.c.[76] veröffentlicht.

Die Hemmung von Glutathionperoxidase durch Jodacetat (Abbildung 16) fällt in mehrfacher Hinsicht auf. Die Vorbehandlung des Enzyms mit GSH wirkt sich hier konträr zu den Befunden mit den übrigen untersuchten Modifizierungsreagenzien aus. Nicht vorbehandelte GSH-Peroxidase wurde nicht inhibiert; nach Vorbehandlung mit GSH wurde das Enzym dagegen in kürzester Zeit vollständig und irreversibel inaktiviert. Besonders bemerkenswert erscheint damit, daß Jodacetamid unter den gleichen Bedingungen GSH-Peroxidase nicht signifikant hemmt. Carboxymethyliertes GSH wurde isoliert (vgl. 2.3.9.5.), zeigte jedoch bei einer Konzentration von etwa 0,8 mM im Aktivitätstest weniger als 10% Hemmung. Damit scheint ausgeschlossen, daß der Hemmeffekt von Jodacetat auf ein Produkt der Reaktion zwischen Alkylierungsreagenz und dem GSH der Vorinkubation zurückzuführen ist.

Zwei Möglichkeiten boten sich an, den Reaktivitätsunterschied zwischen Jodacetat und Jodacetamid zu erklären. Die negative Ladung des Jodacetat-Ions könnte dafür verantwortlich sein, daß das Alkylierungsmittel im Enzymverband eine günstige Position zur Enzymaktivierung erreicht. Andererseits wäre auch vorstellbar, daß die modifizierte Gruppe am Enzym bevorzugt mit Jodacetat reagiert.

Ausgehend von der Annahme, daß Jodacetat von einer positiv geladenen Gruppe an seinem Reaktionsort gebunden werden könnte, wurde die Hemmwirkung von DTNB und DTDP unter identischen Bedingungen untersucht. Wie Abbildung 17 zeigt, ist der Aktivitätsverlust unter den Modifizierungsbedingungen mit dem negativ geladenen DTNB größer als mit dem ungeladenen DTDP. Bei diesem Vergleich blieb allerdings unberücksichtigt, daß sich die beiden Disulfide in ihrer Reaktivität unter den Testbedingungen möglicherweise generell unterscheiden.

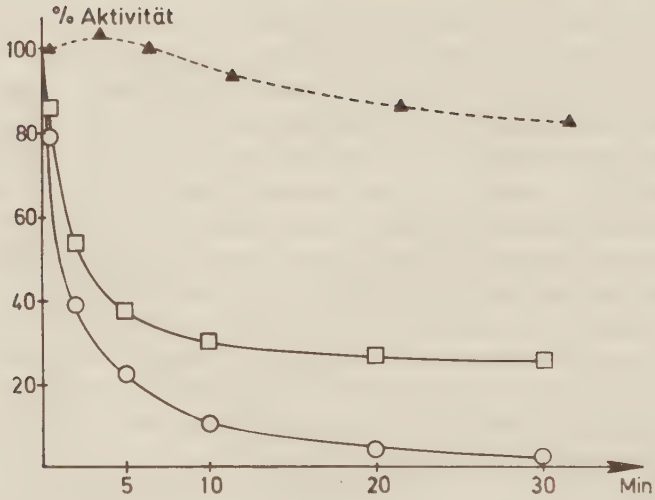


Abb. 17: Vergleich der inaktivierenden Wirkung von 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoat) und Dithiodipyridin auf GSH-Peroxidase.
(50 mM MOPS-Puffer pH 8,1; Disulfide 1 mM;)
-O- DTNB -□- DTDP --▲-- Kontrolle ohne Reagenz

3.6.2. Versuche zur Spezifität einiger Modifizierungsreaktionen

Die im vorhergehenden Abschnitt beobachteten Hemmwirkungen von Tetranitromethan, Jodacetat und der Photooxidation wurden näher untersucht. Dabei sollte versucht werden, Informationen über die Angriffspunkte der Modifizierungsreaktionen zu erhalten.

3.6.2.1. pH-Abhängigkeit der Hemmwirkung von Tetranitromethan

Tetranitromethan ist besonders als Reagenz auf Phenol- und SH-Gruppen bekannt[160]. Um zwischen den beiden Angriffsmöglichkeiten differenzieren zu können, wurde Glutathionperoxidase vor dem Beginn der Modifizierung mit diesem Reagenz mit Jodacetamid versetzt, wodurch das GSH aus der Enzym-Vorinkubation und möglicherweise auch SH-Gruppen des Enzymmole-

moleküls alkyliert werden sollten. Wenn berücksichtigt wird, daß bei diesen Versuchen etwa die dreifache Enzymmenge verwendet wurde, stimmen die in Abbildung 18 a gezeigten Hemmkurven jedoch etwa mit den Versuchen überein, bei denen Jodacetamid nicht verwendet wurde (siehe Abb. 14).

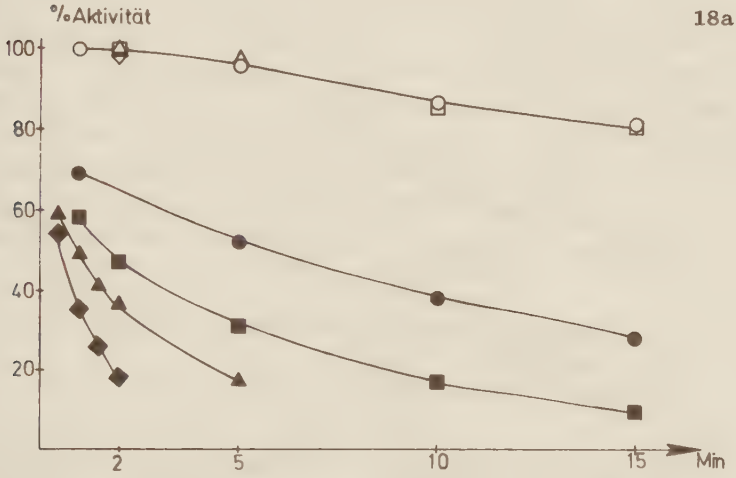


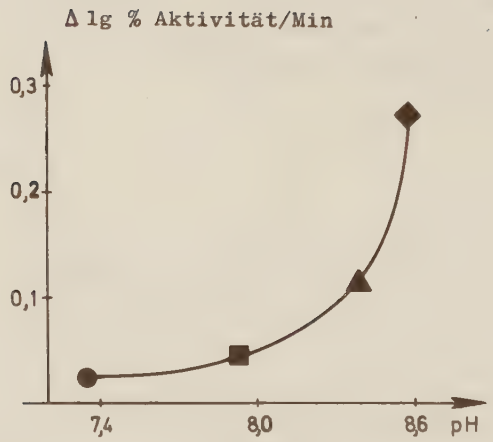
Abb. 18: pH-Abhängigkeit der Hemmwirkung von Tetranitromethan an Glutathionperoxidase nach Vorinkubation mit GSH und einem Überschuß an Jodacetamid.

(ca. o,o5 nMol Enzym, o,4 µMol GSH, 1o Min, o,8 µMol Jodacetamid, 5 Min, o,5 µMol TNM)

a) Zeitabhängigkeit der Hemmung in:

- ●— o,1 M TES-Puffer pH 7,36
- ■— o,1 M TES-Puffer pH 7,93
- ▲— o,1 M BIS/Acetat-Puffer pH 8,39
- ◆— o,1 M BIS/Acetat-Puffer pH 8,57

Leere Symbole bezeichnen die entsprechenden Kontrollwerte.



b) pH-Abhängigkeit der logarithmierten Inaktivierungsgeschwindigkeit.
Die Symbole entsprechen den Serien der Abb. 18 a

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung zwischen Tetranitromethan und Phenolen ist den Konzentrationen von Reagenz und Phenolat-Ion proportional[20]. In den Modifizierungsansätzen war Tetranitromethan in etwa 2000-fachem Überschuß über die Enzymmolarität eingesetzt. Die Kinetik der Inaktivierung sollte also einer Reaktion pseudo 1. Ordnung entsprechen. Die logarithmierten Inaktivierungsgeschwindigkeiten bei verschiedenen pH-Werten müßten dann als Maß für die jeweilige Konzentration an Phenolat gelten können und damit der Dissoziation dieser Gruppe folgen. Abbildung 18 b zeigt, daß tatsächlich eine pH-Abhängigkeit gefunden wurde, die oberhalb von pH 8 stark ansteigt. Ungünstigerweise fiel bei dieser Untersuchung die Aktivität der Kontrollansätze ebenfalls deutlich ab, ein Effekt, der möglicherweise durch die Kombination von Jodacetamid mit Äthanol verursacht wurde. Die quantitative Auswertung entsprechender Versuche wurde daher unterlassen.

3.6.2.2. pH-Abhängigkeit und Donorsubstrat-Spezifität der photooxidativen Hemmung von GSH-Peroxidase

Durch Photooxidation können verschiedene proteingebundene Aminosäuren angegriffen werden: Histidin, Tyrosin, Tryptophan, Methionin und Cystein[159]. Die Verwendung von Bengalrosa soll die Oxidation des Imidazolsystems begünstigen[270]. In verschiedenen Fällen erwies sich eine pH-abhängige Untersuchung der Photooxidation als aufschlußreich. Parallel der Imidazolium-Dissoziation erhöht sich die Oxidationsneigung von Histidin im Bereich um pH 6[270, 79]. Tyrosin wird leicht im Alkalischen, Methionin und Tryptophan schon im Sauren oxidiert. Proteingebundenes Methionin, das auf diese Weise zum Sulfoxid aufoxidiert worden war, konnte in einigen Fällen durch Thiole reduziert und reaktiviert werden[122].

19a)

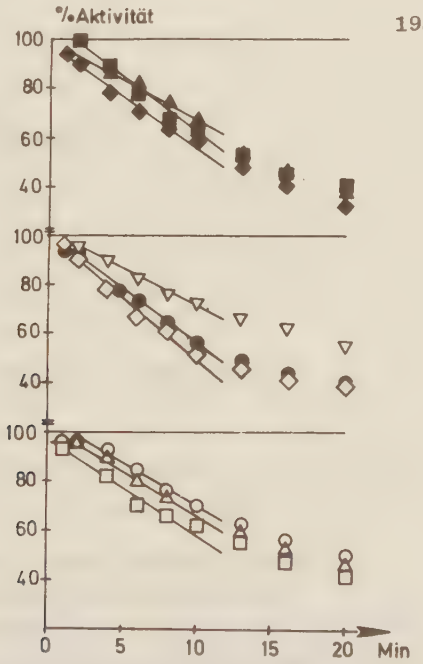


Abb. 19: Photooxidative Hemmung von GSH-Peroxidase zwischen pH 6 und 10
Bestrahlungsansatz: 4,5 nMol Enzym, o,oo1% Bengalrosa, 21°C, 5oo W (75 cm Abstand)

a) Zeitabhängigkeit der Hemmung
offene Symbole: 1o mM MOPS-Puffer
gefüllte Symbole: 1o mM BIS/Acetat-Puffer

Symbol	Puffer-pH	Symbol	Puffer-pH
○	6,3o	●	8,oo
□	6,64	■	8,6o
△	6,94	▲	9,19
◇	7,5o	◆	9,76
▽	8,1o		

19b)

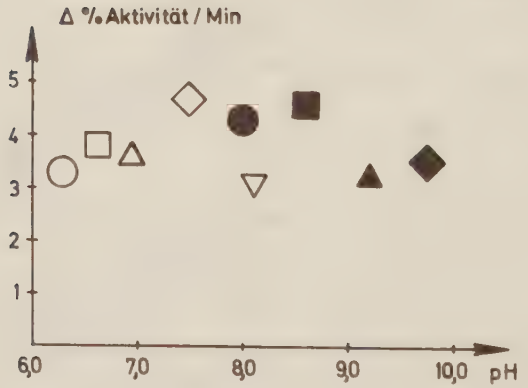


Abb.19: b) pH-Abhängigkeit der Hemmgeschwindigkeiten zwischen 2 und 12 Minuten

Die Symbole entsprechen den Meßserien in Abb. 19a

Abbildung 19a zeigt, daß die photooxidative Hemmung von GSH-Peroxidase während der ersten 1o Minuten zwischen pH 6 und 1o keine charakteristischen Veränderungen aufweist. Der unheitliche Verlauf der Inaktivierung erschwerte allerdings die Ermittlung der Inaktivierungsgeschwindigkeiten und erklärt zugleich die hohen Streuungen. Dieser Effekt ist vermutlich als Ausdruck komplexerer

Oxidationsvorgänge am Enzymmolekül zu werten. Dadurch schien es bedenklich, von der relativ pH-unabhängigen Inaktivierungsgeschwindigkeit auf die Oxidation bestimmter Enzymbestandteile zu schließen.

Trotzdem sollte weiter überprüft werden, ob die strahlungsinduzierte Oxidation an GSH-Peroxidase Wirkungen zeigt, die mit der Donorsubstratspezifität des Enzyms zusammenhängen könnten. Die Umsatzraten der Aliquots aus einem Bestrahlungsansatz wurden deshalb mit sechs verschiedenen Donorthiolen im Standard-Aktivitätstest geprüft.

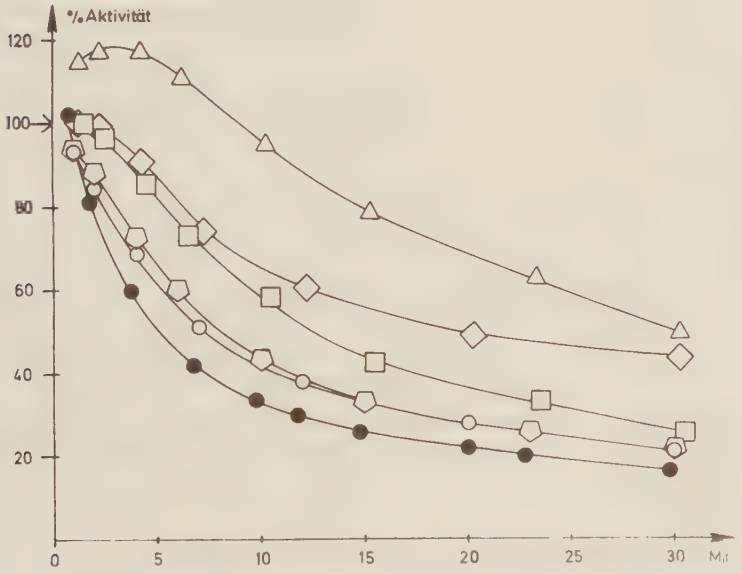
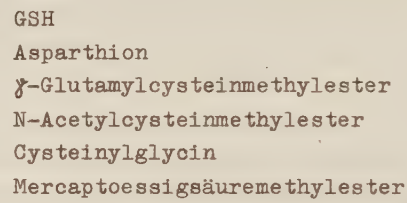


Abb. 20: Photooxidative Hemmung von Glutathionperoxidase getestet mit verschiedenen Donorsubstraten. Bestrahlungsansatz: 3o mM TES-Puffer pH 7,o, 1o nMol Enzym, o,oo1% Bengalrosa, 37°C, 5oo W (75 cm)

getestet im Standard-Aktivitätsansatz mit:



Die zeitliche Veränderung in diesen Ansätzen ist in Abbildung 20 dargestellt. Es fällt zunächst auf, daß sich der Umsatz von spezifischen Substrat, GSH, unterschiedlich zu dem von unphysiologischem Donor, Mercaptoessigsäuremethylester, entwickelte. Die Umsätze mit den übrigen Donorsubstraten lagen in folgender Abstufung zwischen diesen Extremen: GSH, Asparthion und γ-Glutamylcysteinmethylester, N-Acetylcysteinmethylester, Cysteinylglycin, Mercaptoessigsäuremethylester. Die deutlichsten Unterschiede der Zeitabhängigkeitskurven traten in den ersten Minuten der Bestrahlung auf. Die Tendenz, daß die Aktivität einer bestrahlten Probe in diesem Zeitraum nicht ab- sondern zunimmt, ist schon aus Abbildung 15 ersichtlich. Der Umsatz mit Mercaptoessigsäuremethylester war nach drei Minuten Bestrahlung um fast 20% erhöht, während er mit GSH als Donor nur noch 60% des Anfangswerts erreichte. In der ersten Phase der Photooxidation scheint also möglicherweise zunächst die spezifische Bindung zwischen GSH und Enzym betroffen zu werden. Die Reaktion der unphysiologischen Donorsubstrate könnte dagegen durch konformative Veränderungen erleichtert sein.

3.6.2.3. pH-Abhängigkeit der Jodacetat-Hemmung

Auch die Hemmung von GSH-vorinkubierter Glutathionperoxidase mit Jodacetat wurde pH-abhängig untersucht. Die Alkylierung von Thiolgruppen sollte durch deren Dissoziation bestimmt werden und deshalb mit steigendem pH-Wert beschleunigt erfolgen. Auch die Alkylierungsgeschwindigkeit mit Imidazol- oder Aminogruppen sollte um pH 6 bzw. über pH 8 in diesem Sinne ansteigen.

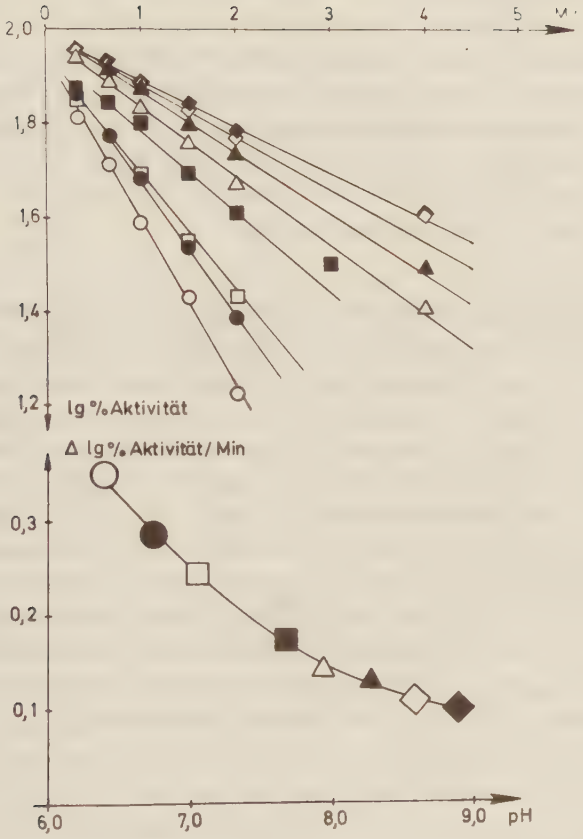


Abb. 21: pH-Abhängigkeit der Hemmung von GSH-vorbehandelter GSH-Peroxidase durch Jodacetat
0,25 M TES-Puffer; o,2 nMol Enzym; o,4 µMol GSH; 2o Min.; 0,8 µMol Jodacetat; 37°C.

Symbol	Puffer-pH	Symbol	Puffer-pH
○	6,4o	△	7,93
●	6,74	▲	8,27
□	7,o4	◇	8,57
■	7,66	◆	8,89

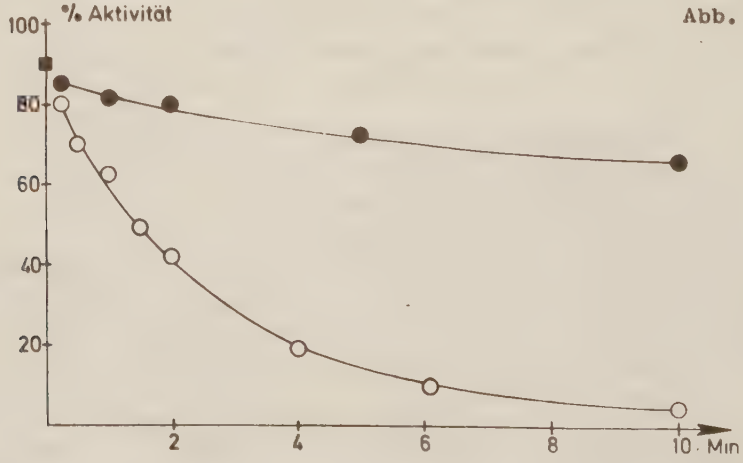
Abb. 21: a) Zeitabhängigkeit der logarithmierten Restaktivitäten
b) pH-Abhängigkeit der logarithmierten Inaktivierungsgeschwindigkeiten

Wie Abbildung 21 jedoch zeigt, verläuft die Hemmung von Glutathionperoxidase durch Jodacetat entgegengesetzt. Zwischen pH 6 und pH 9 nimmt die logarithmierte Inaktivierungsgeschwindigkeit stark ab (Abb. 21b). Das pH-abhängige Verhalten der Jodacetat-Hemmung läßt sich deshalb nicht einfach mit der Dissoziation der alkylierten Gruppe erklären.

3.6.3. Titration der redoxaktiven Zentren von Glutathionperoxidase mit Hilfe der Jodacetat-Hemmung*

Die Spezifität der Hemmung von GSH-Peroxidase durch Jodacetat geht aus Abbildung 16 hervor. Es stellte sich die Frage, ob die Vorbehandlung des Enzyms mit GSH als möglicherweise konformationsbedingte Aktivierung oder als Reduktion im Sinne der postulierten "Ping-Pong"-Reaktionsfolge (vgl. 1.1.3.2.) aufzufassen war. Die letztgenannte Möglichkeit würde aber bedeuten, daß die Modifikation mit Jodacetat in selektiver Weise auf das reaktive Zentrum des Enzyms einwirken könnte. Unter der Annahme, daß nur die reduzierte Enzymform durch Jodacetat alkyliert würde, müßte die Rückoxidation GSH-behandelter Glutathionperoxidase durch Wasserstoffperoxid die Jodacetat-Hemmung verhindern.

Abb.: 22



* Das Ergebnis wurde in l.c.[76] veröffentlicht

Abb. 22: Abhängigkeit der Hemmwirkung von Jodacetat vom Redoxzustand von Glutathionperoxidase.
Ansatz: o,5 nMol Enzym in 6o mM TES-Puffer pH 8,o; o,1 µMol GSH; 35 Min; o,2 µMol Jodacetamid; 15 Min.; o,1 µMol GSH; (o,25 µMol H_2O_2); o,2 µMol Jodacetat.

-○- ohne H_2O_2 -●- mit H_2O_2

■ Kontrolle nach GSH/Jodacetamid/GSH-Vorbehandlung

Genau diese Verhältnisse sind aus den beiden Meßserien abzuleiten, die in Abbildung 22 dargestellt sind. Das Enzym wurde zunächst mit GSH inkubiert und nacheinander mit der doppelten Menge Jodacetamid und wiederum mit GSH behandelt. Jodacetamid sollte mögliche unspezifische Alkylierungen antizipieren, die durch eine Modifikation mit Jodacetat zu Ladungsveränderungen am Enzym führen müßten. Einer der erneut GSH-vorinkubierten Ansätze wurde mit einem Überschuß Jodacetat versetzt, worauf erwartungsgemäß die Enzymaktivität innerhalb von 10 Minuten praktisch vollständig verloren ging. Ein Parallelansatz wurde kurz vor Beginn der Carboxymethylierung mit H_2O_2 behandelt. In diesem Fall verringerte sich die Aktivität in 1o Minuten lediglich auf 70% des ursprünglichen Werts.

Da Wasserstoffperoxid in fallenden Konzentrationen die Hemmung durch Jodacetat nur partiell und schließlich nicht mehr verhinderte, schien sich die Möglichkeit zu ergeben, das Ausmaß der Enzymhemmung durch dieses Reagenz als spezifischen Indikator für reduzierte Glutathionperoxidase zu verwenden. Wenn nun reduziertes Enzym mit steigenden Mengen Hydroperoxid versetzt würde, müßte aus den Mengen an Enzym und Akzeptorsubstrat am Äquivalenzpunkt die Anzahl der reaktiven Zentren von Glutathionperoxidase zu ermitteln sein. Der Äquivalenzpunkt dieser Titration wäre dann erreicht, wenn GSH-Peroxidase gerade nicht mehr durch Jodacetat gehemmt wird.

Der Durchführung dieser Titration standen zunächst noch einige methodische Schwierigkeiten im Weg. Die in der Vorlage verwendeten Enzymmengen erforderten, daß das Oxidationsmittel

im Zehntel-Nanomol-Bereich verwendet werden mußte. Obwohl Wasserstoffperoxid durch das reaktionsträgere t-Butylhydroperoxid ersetzt wurde, mußten, abweichend von den qualitativen Vortests, GSH und die niedermolekularen Reaktionsprodukte der Vorbehandlung mit GSH und Jodacetamid entfernt werden, um das Oxidationsmittel nicht vorzeitig zu verbrauchen. Zu diesem Zweck wurde das reduzierte Enzym durch Gelfiltration von den niedermolekularen Substanzen abgetrennt, bevor die Teilansätze mit verschiedenen Mengen t-Butylhydroperoxid versetzt und die Modifizierung durch Jodacetat gestartet wurde. Abbildung 23a zeigt, daß nach dieser Behandlung GSH-Peroxidase maximal nur noch zu 70% gehemmt werden konnte.

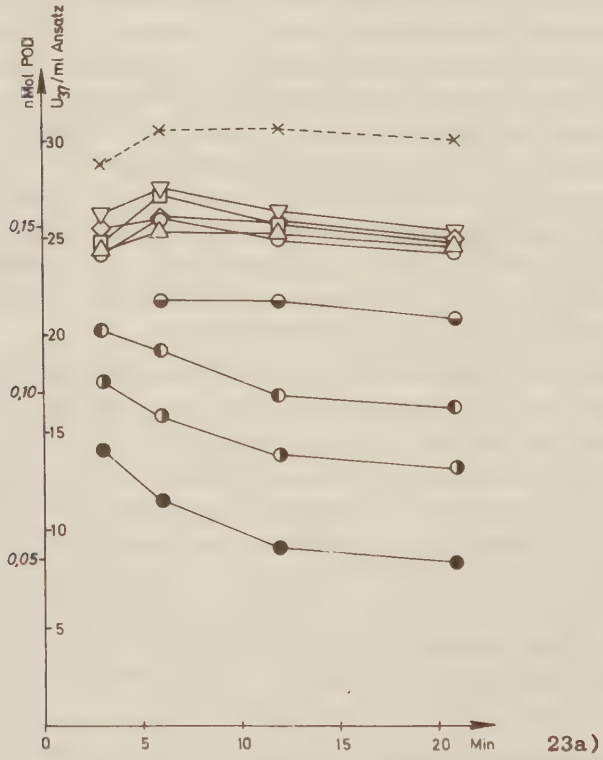


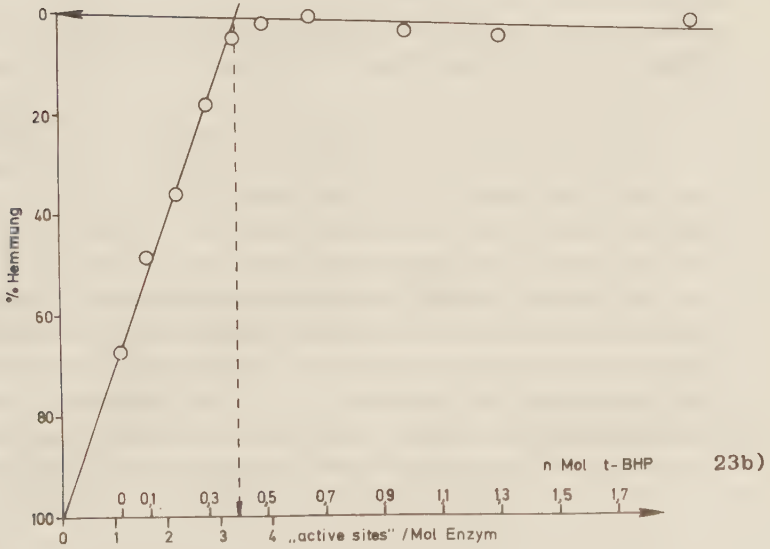
Abb. 23: "Active-Site-Titration" von Glutathionperoxidase (POD) mit t-Butylhydroperoxid (t-BHP) mit Hilfe der Jodacetat-Hemmung als Indikator.

Ansatz (nach GSH/Jodacetamid-Vorbehandlung und Gelfiltration): o,18 nMol Enzym in o,2M TES-Puffer pH 7,o; 0 - 1,9 nMol t-BHP; 3o nMol Jodacetat

a) Zeitabhängigkeit der Aktivität in den einzelnen Ansätzen

Symbol	nMol t-BHP	Symbol	nMol t-BHP
●—	o	—▽—	o,65
—◑—	o,o98	—□—	o,78
—◐—	o,19	—△—	o,97
—◉—	o,3o	—◇—	1,95
—○—	o,39		

--X-- Kontrollansatz ohne t-BHP und Jodacetat



23b)

Abb. 23: b) Titrationskurve aus den Aktivitätswerten nach 21 Minuten Jodacetat-Inkubation

◀- - - Der Pfeil markiert den Äquivalenzpunkt; Die Anzahl der "active sites" pro Molekül Enzym sind unter Berücksichtigung des nicht hemmbaren Anteils von GSH-Peroxidase angegeben.

Da das Ausmaß der erreichbaren Hemmung vor allem von dem vorausgegangenen Chromatographieschritt abhing, konnte angenommen werden, daß während dieses Vorgangs trotz verschiedener Vorkehrungen (vgl. 2.3.9.7.) die nun nicht mehr hemmbare Enzymmenge spontan aufoxidiert war.

In Abbildung 23b wurden die Aktivitätswerte, die nach 21 Minuten Inkubationszeit mit Jodacetat erreicht waren, den Molmengen t-Butylhydroperoxid in den einzelnen Hemmansätzen zugeordnet. Der Äquivalenzpunkt der Titration ließ sich bei o,4 nMol t-Butylhydroperoxid extrapolieren. Aus der enzymatischen Aktivität des Kontrollansatzes, eines Parallelansatzes ohne Hydroperoxid und Jodacetat, wurde die vorgelegte Enzymmenge zu 0,18 nMol errechnet (bei einer angenommenen maximalen spezifischen Aktivität von 55o U_{37}/mg d.h. 1 U_{37}/ml entsprechen 2,17 x $1o^{-8}$M Enzym). Aus diesen Werten ergeben sich 2,2 reaktive Zentren pro Molekül Glutathionperoxidase. Wird dagegen der erwähnte Verlust an titrierbarem Enzym durch spontane Oxidation berücksichtigt, so sollte GSH-Peroxidase 3,3 "active sites" pro Molekül enthalten. Wohl ist einerseits mit Fehlern in der "Maßlösung" t-Butylhydroperoxid zu rechnen, die bei verringerter Konzentration die Zahl der aktiven Zentren nach unten verschieben könnten. Andererseits bleibt die Ursache der Diskrepanz zwischen Kontrollwert-Aktivität und der extrapolierten Aktivität von 0% Hemmung unerklärt. Möglicherweise könnte durch den ungünstigeren Bezugswert die titrierte Enzymmenge zu hoch veranschlagt worden sein. Unter den vorangestellten Annahmen läßt sich zusammenfassend schließen, daß Glutathionperoxidase jedenfalls mehr als 2, vermutlich 4 reaktive Zentren pro Enzymmolekül besitzt.

3.7. Untersuchungen zum Aminosäuregehalt von Glutathionperoxidase

3.7.1. Analyse nach Hydrolyse mit p-Toluolsulfonsäure

Die Aminosäurezusammensetzung von hochgereinigter Rinder-Glutathionperoxidase sollte die molekulare Charakteristik dieses Enzyms ergänzen. Vorversuche hatten einen verhältnismäßig hohen Tryptophangehalt des Enzyms angenommen[69]. Zur Hydrolyse der Enzymproben wurde deshalb die schonende Hydrolyse-Methode nach Liu und Chang[139] angewandt, die 3 M p-Toluolsulfonsäure mit einem Tryptamin-Zusatz als Hydrolyse-Reagenz verwendet. Wie von diesen Autoren beschrieben, ergaben sich bei einer Probe-Hydrolyse von Cytochrom c für Tryptophan und die meisten anderen Aminosäuren vielversprechende Übereinstimmungen mit den theoretischen Werten.

Tabelle 6: Aminosäureanalyse nach p-Toluolsulfonsäure-Hydrolyse; Angaben in Molen Aminosäure pro Mol Protein

	Cytochrom c (Pferd)			Glutathionperoxidase (Rind)				
AS	soll*	24 h	48 h	24 h	48 h		72 h	96 h	ca.
Asp	8	6,45	7,04	70,1	67,3	75,0	60,2	73,1	69
Thr	10	8,79	8,66	36,0	37,7	36,3	36,5	36,8	37
Ser	0			37,5	36,4	35,5	30,5	35,0	36
Glu	12	10,1	10,72	69,8	70,8	80,3	63,2	70,9	70
Pro	4	4,49	4,44	52,5	54,8	54,9	52,3	54,4	54
Gly	12	12,15	12,02	61,0	60,5	62,5	63,8	61,0	62
Ala	6	6,54	5,85	50,5	50,8	50,4	50,7	50,5	51
1/2Cys	0			6,3	7,6	7,3	6,7	6,2	7
Val	3	2,99	2,92	50,2	51,2	51,0	53,8	52,3	52
Met	2	1,59	1,62	8,1	10,2	9,3	8,2	10,6	9
Ile	6	5,79	6,28	24,4	25,4	25,5	25,0	25,6	25
Leu	6	6,36	6,39	81,2	80,0	81,0	85,3	80,5	82
Tyr	4	4,21	4,33	16,4	16,6	16,2	17,2	17,0	17
Phe	4	3,64	4,44	49,3	50,0	50,5	53,0	50,8	51
Trp	1	0,98	1,02	6,9	7,3	8,3	6,5	6,6	7
Lys	19	19,34	20,35	28,2	28,8	21,8	26,0	27,8	28
His	3	3,08	3,25	8,1	8,3	7,2	9,5	9,0	9
NH_3 Arg	14 2	14,0 2,24	11,92 2,27	89,0 53,2	60,2 53,1	69,0 53,9	68,0 53,8	64,5 53,8	66 54

* nach l.c.[45]

Neben den Ergebnissen dieser Voruntersuchung gibt Tabelle 6 die ermittelten Molzahlen der verschiedenen Aminosäuren pro Mol GSH-Peroxidase an. Die analysierten Molmengen der einzelnen Aminosäuren unterschieden sich in den Hydrolyse-Ansätzen um ca. 10%. Möglicherweise sind Verluste während der Hydrolyse-Prozedur oder durch Adsorption an den Niederschlag in einigen Hydrolyse-Ansätzen (vgl. 2.3.10.1.) für die verminderten Ausbeuten verantwortlich. Die theoretische Einwaage an Enzym wurde deshalb dem Ansatz mit den höchsten Alanin- bzw. Arginin-Werten zugeordnet (Ansatz 48 h) und die anderen Hydrolyse-Ansätze über ihren Gehalt an diesen Aminosäuren korrigiert. Dieses Vorgehen wird durch eine gute Übereinstimmung zwischen den Aminosäuregehalten der einzelnen Hydrolyse-Ansätze gerechtfertigt. Die relative Aminosäure-Zusammensetzung scheint damit verhältnismäßig zuverlässig, während bei der absoluten Zahl der Aminosäuren mit erheblichen Fehlern gerechnet werden muß.

Als Ergebnis der Aminosäure-Analyse von GSH-Peroxidase aus Rinderblut kann jedenfalls festgehalten werden, daß dieses Enzym 1. relativ viel Prolin und 2. nur wenige Tryptophanreste enthält. Punkt 1 bestätigt frühere Ergebnisse, bei denen der α-Helixgehalt des Enzymmoleküls, bestimmt mit optischer Rotationsdispersion, sehr gering veranschlagt wurde[69]. Die zweite Feststellung widerspricht früheren Vermutungen und wurde deshalb mit der photometrischen Bestimmung des Tyrosin/Tryptophan-Quotienten nach Bencze und Schmid[13] überprüft (siehe 3.7.3.).

3.7.2. Aminosäure-Analyse nach Perameisensäure-Oxidation von GSH-Peroxidase

Es sei hervorgehoben, daß die Aminosäureanalysen durchgeführt wurden, bevor das Vorkommen von Selen in Glutathionperoxidase aus Rinderblut gesichert war. Es schien zu diesem Zeitpunkt geboten, die Anzahl der Cystein/Cystin-Reste des Enzyms durch Vorbehandlung mit Perameisensäure genauer zu erfassen. Bei der Analyse der entsprechenden Hydrolyse-Ansätze oxidierten Enzyms zeigte es sich jedoch, daß der Cysteinsäure-Peak, anders als bei der Probe-Analyse oxidierter

Rinder-Ribonuklease, eine Schulter aufwies, die die Auswertung dieser Aminosäure erschwerte.

Tabelle 7: Aminosäureanalysen nach Vorbehandlung mit Perameisensäure; Hydrolysen mit 6 N HCl (Ribonuklease) bzw. p-Toluolsulfsonsäure (GSH-Peroxidase); Angaben in Molen Aminosäure pro Mol Enzym.

	Ribonuklease (Rind)				GSH-Peroxidase (Rind)			
AS	soll*	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	ca.
$CySO_3H$	8	7,28	6,90	7,24	-	15,0	15,8	15
Asp	15	14,96	13,88	13,63	66,5	65,5	66,0	66
Thr	10	10,02	9,95	9,65	43,5	44,5	-	44
Ser	15	15,04	12,25	13,96	38,0	37,6	-	38
Glu	12	11,96	12,03	12,33	65,5	65,5	64,0	65
Pro	4	3,88	4,16	3,78	56,2	53,4	53,2	54
Gly	3	3,31	3,12	3,46	62,3	61,8	63,5	63
Ala	12	12,05	11,95	11,68	47,2	47,0	47,2	47
Val	9	6,95	7,94	8,09	43,5	49,5	51,3	52
Met	4	-	-	-	-	-	-	-
Ile	3	1,21	1,56	1,70	22,5	23,2	28,4	28
Leu	2	2,26	2,00	2,09	89,0	78,0	91,5	90
Tyr	6	-	-	-	-	-	-	-
Phe	3	2,83	2,67	2,61	49,5	48,0	52,0	50
Trp	0				-	-	-	-
Lys	10	9,78	10,21	9,86	34,4	29,0	31,4	30
His	4	1,29	1,21	1,40	9,2	9,3	10,2	10
NH_3	17	19,45	18,44	26,75	130	132	140	132
Arg	4	3,82	3,90	5,50	57,1	55,0	62,2	60

*nach l.c.[239]

Da Selen in der sauren Hydrolyse möglicherweise nicht nur die schefelhaltigen sondern auch die oxidationsempfindlichen Aminosäuren beeinflussen kann, sind die Gehaltsangaben dieser Aminosäuren in den Tabellen 6 und 7 nur mit Vorbehalt zu bewerten.

3.7.3. Photometrische Bestimmung des Tyrosin/Tryptophan-Quotienten nach Bencze und Schmid[13]

Zur photometrischen Bestimmung des Tyrosin/Tryptophan-Verhältnisses wird das UV Absorptionsspektrum der alkalischen (pH > 12) Proteinlösung ausgewertet.

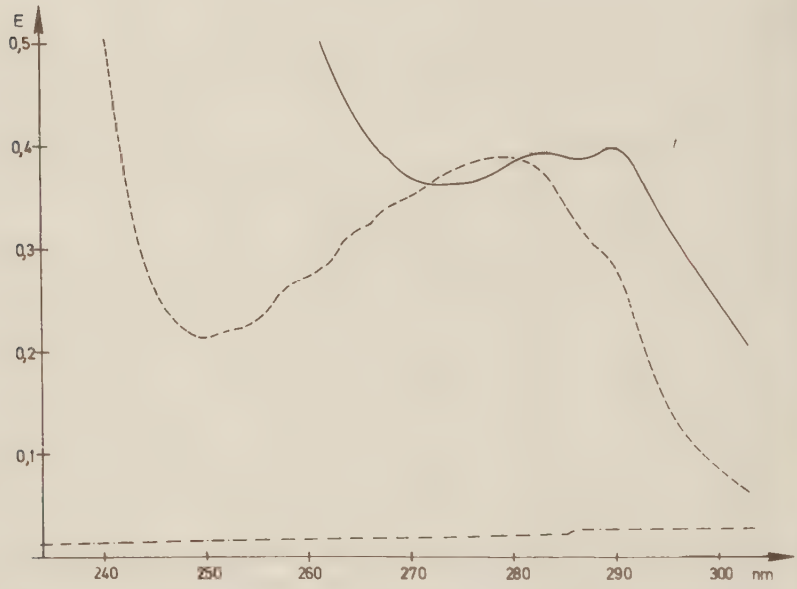


Abb. 24: Absorptionsspektren von hochgereinigter GSH-Peroxidase aus Rinderblut (0,25 mg/ml)

—·—·—· Küvetten-Leerwert
— — — natives Enzym
———— Enzym bei pH > 12
.....t Tangente an den Maxima bei 290 und 283 nm zur Auswertung nach Bencze und Schmid[13]

Abbildung 24 zeigt zunächst das UV-Absorptionsspektrum von nativer, hochgereinigter Glutathionperoxidase aus Rinderblut (vgl. l.c.[69, 96]) mit einem Minimum bei 250 nm, einem Maximum bei 279 nm und Schultern bei 253, 259, 265, 269 und 289 nm. Der Quotient E_{280}/E_{250} belief sich auf 1,85. Oberhalb

von 32o nm war keine signifikante Absorption zu verzeichnen. Gemäß den Beispielen von Bencze und Schmid[13] zeigte das Spektrum von GSH-Peroxidase in alkalischer Lösung zwei Maxima (bei 283 und 29o nm), die annähernd gleiche Absorptionswerte aufwiesen. Die Auswertung erfolgte über die Steigung der Tangente (t) an die Maxima (siehe Abb. 24) und den Absorptionswert bei 29o nm. Der S-Wert errechnete sich zu 1,59 (vgl. 2.3.12.). Der Vergleich mit den S-Werten von Modell-Lösungen nach Bencze und Schmid[13] ordneten diesem Wert ein Tyrosin/Tryptophan-Verhältnis von 1,5 und einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon^{1\%}_{1\ cm}$ von 174 zu (siehe Abb. 25).

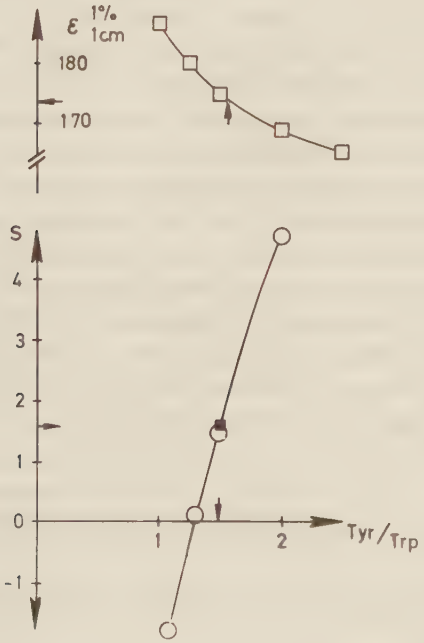


Abb. 25: Zur Bestimmung des Tyrosin/Tryptophan-Quotienten (Try/Trp) von GSH-Peroxidase (vgl. 2.3.12.)

$\varepsilon^{1\%}_{1\ cm}$: Extinktionskoeffizient einer 1%igen Lösung an Tyrosin und Tryptophan bei 1 cm Schichtdicke

markieren die graphische Auswertung der Daten von Glutathionperoxidase

Aus dem Extinktionskoeffeizienten errechnete sich die prozentuale Konzentration der Proteinlösung an Tryptophan und Tyrosin zu 1,06 x 10^{-3}%. Aus der Extinktion der nativen Enzymlösung bei 280 nm läßt sich der prozentuale Gehalt der verwendeten GSH-Peroxidase-Lösung zu 11,8 x 10^{-3}% berechnen (E_{280} = 1 = 1,35 mg/ml; vgl. l.c.[67]). Aus diesen Daten resultiert mit 9% ein relativ hoher Gehalt an Tyrosin und Tryptophan in Glutathionperoxidase. Bei dem veranschlagten Verhältnis zwischen Tyrosin und Tryptophan müßte mit etwa 24 Tyrosin- und 16 Tryptophanresten pro Enzymmolekül gerechnet werden. Die große Diskrepanz zwischen diesen Werten und dem Ergebnis der Aminosäure-Analyse an hydrolisiertem Enzym könnte einerseits durch Unsicherheiten in der photometrischen Proteinbestimmung, andererseits aber auch durch die Möglichkeit begründet sein, daß das untersuchte Spektrum von GSH-Peroxidase nicht allein von Tyrosin und Tryptophan bestimmt wird. Ein unberücksichtigter Chromophor in dieser Region, wie er bei der Anwesenheit von Selen denkbar ist (vgl. l.c.[128]) würde die Auswertung nach Bencze und Schmid[13] hinfällig werden lassen.

3.8. Selengehalt von Glutathionperoxidase aus Rindererythrocyten

3.8.1. Quantitative Bestimmung von Selen in hochgereinigter GSH-Peroxidase*

Die Ergebnisse von Rotruck et al.[198] über die Selen-Abhängigkeit der GSH-Peroxidase in Ratten gaben den Anstoß, den Selengehalt in dem hochgereinigten Enzym aus Rinderblut zu analysieren. Bei der zur Verfügung stehenden Enzymmenge

*Das Ergebnis wurde in l.c.[75] veröffentlicht

lag die minimal zu erwartende Selenmenge im Mikrogramm-Bereich. Der Erfolg einer quantitativen Selenanalyse hing unter diesen Bedingungen entscheidend von der analytischen Methodik ab.

Durch die ungünstige Lage der Selen-Linie schied eine Analyse durch Atomabsorption aus[194]. Als weitere empfindliche Selenbestimmungsmethoden standen zur Diskussion:

1. die Überführung von Selen in Phenylderivate mit anschließender gaschromatographischer Analyse[217] und
2. die fluoreszenzanalytische Bestimmung von Selen (IV) in Form seines 2, 3-Diaminonaphthalin-Piazselenids[266].

Die umfangreichen Veraschungs- und Umsetzungsverfahren, die in diesen Fällen notwendig gewesen wären, schienen mit ihren vielfältigen Fehlermöglichkeiten für eine materiallimitierte, quantitative Analyse zu riskant.

Die günstigste Lösung bot die Neutronenaktivierungsanalyse. Der Aufwand an Zeit und Geräten kann dadurch gerechtfertigt werden, daß das lyophilisierte Probenmaterial unverändert analysiert werden konnte: die quantitative Analyse der bestrahlten Proben über deren γ-Spektren (aufgenommen mit einem Ge(Li)-Detektor) war ohne chemische Aufbereitung möglich[205]. Die Fehlermöglichkeiten konnten damit auf die Vorbereitung der Analysen- und Standard-Proben, den Gerätefehler und die Unsicherheiten bei der Auswertung der Analysedaten beschränkt werden. Bei einer Erfassungsgrenze dieser Selenbestimmungsmethode um 2o ng konnte die eingesetzte Probenmenge an GSH-Peroxidase auf 0,7 mg beschränkt werden.

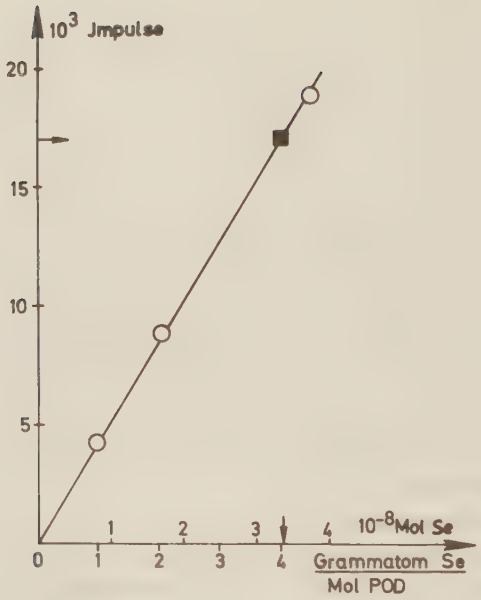


Abb. 26: Eichkurve zur Analyse des Selengehalts von GSH-Peroxidase (POD)

—○— Standard-Proben (Selenomethionin)

→ ■ Auswertung der Probe mit 0,7 mg Glutathion-peroxidase

Abbildung 26 zeigt die Auswertung der ermittelten Impulse mit Hilfe der Selen-Standardwerte. Bei einem angenommenen Fehler von ± 10% kann der Selengehalt von Glutathionperoxidase aus Rindererythrocyten mit 4,05 Grammatome Selen pro Mol Enzym angegeben werden. Damit wurde erstmals die Stöchiometrie dieses Elements in einem hochgereinigten Proteinmolekül bestimmt.

3.8.2. Selenvorkommen im p-Toluolsulfonsäure-Hydrolysat von GSH-Peroxidase

Wie schon erwähnt, waren die Proben zur Aminosäurezusammensetzung von GSH-Peroxidase schon hydrolysiert, bevor das Ergebnis der Selenanalyse bekannt war. Mehrfach wurde berichtet, daß proteingebundenes Selen gegenüber der sauren Hydrolyse mit HCl oder H_2SO_4 nicht stabil sei[15,112,216]. Weil in getrennten Vergleichsansätzen Selenocystin und Selenomethionin die p-Toluolsulfonsäurebehandlung offenbar ohne gravierende Veränderungen überstanden hatten (vgl. Abb. 27c), schien es trotzdem denkbar, von der Selenanalyse des aufgetrennten Enzymhydrolysats auf die Art des gebundenen Selens in GSH-Peroxidase zurückzuschließen.

Das Eluat der ionenaustauschchromatographischen Analyse am Aminosäure-Analysator wurde deshalb fraktioniert. Verschiedene Regionen des aufgetrennten 24-Stunden-Hydrolysats (vgl. Tab. 6), besonders die Bereiche, in denen Selenoaminosäuren oder deren Oxidationsprodukte eluiert werden, wurden mit Hilfe der Neutronenaktivierung auf ihren Selengehalt untersucht.

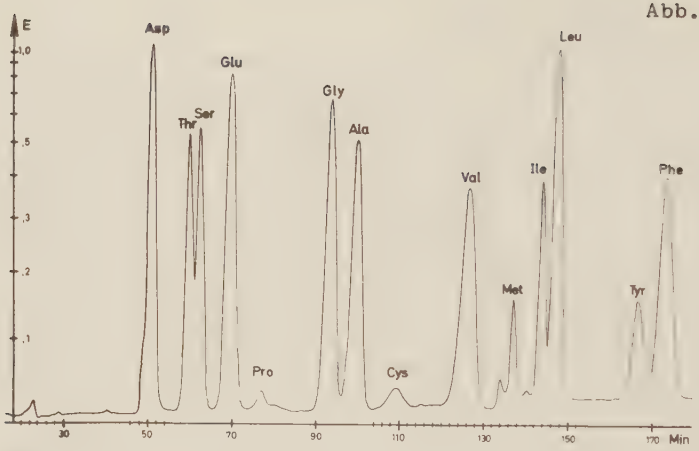
Abb. 27: Zur Selenanalyse nach p-Toluolsulfonsäure-Hydrolyse von GSH-Peroxidase: Eluat der langen Austauschersäule

a) Ninhydrin-positives Material (aufgetragen: 2,5 nMol Enzymhydrolysat); die auf Selen analysierten Fraktionen sind auf der Abszisse markiert.

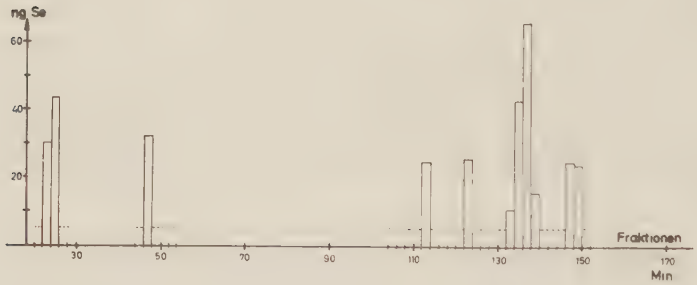
b) Selengehalt einiger Fraktionen der selben Hydrolysat-Auftrennung wie a).
-------- Erfassungsgrenze der Selenanalyse

c) Aminosäure-Analysen von einzelnen Selenoaminosäuren nach 24 h p-Toluolsulfonsäure-Hydrolysebehandlung (vgl. l.c.[154]).
———— Selenocystin
— — — — Selenomethionin

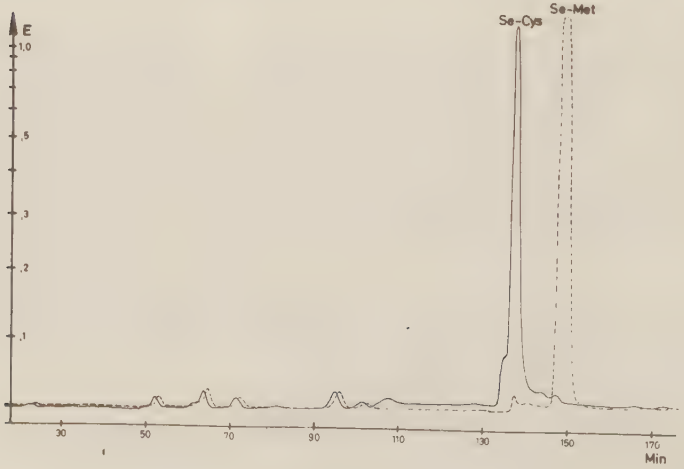
Abb.: 27


E
1,0
,5
,3
,2
,1
Asp
Thr
Ser
Glu
Pro
Gly
Ala
Cys
Val
Met
Ile
Leu
Tyr
Phe
30
50
70
90
110
130
150
170 Min

a)


ng Se
60
40
20
30
50
70
90
110
130
150
170
Min
Fraktionen

b)


E
1,0
,5
,3
,2
,1
Se-Cys
Se-Met
30
50
70
90
110
130
150
170
Min

c)

Die Abbildungen 27a und b zeigen die Auftrennung des Hydrolysats an der langen Säule. Dem Ninhydrin-positiven Material ist der Selengehalt der einzelnen Fraktionen und das Elutionsverhalten von Selenocystin und Selenomethionin (bei gleicher Vorbehandlung in getrennten Ansätzen) gegenübergestellt. Nach dieser Darstellung wurde die Hauptmenge an Selen in der Region des Selenocystin-Peaks eluiert. Allerdings erschienen auch signifikante Selenmengen im Bereich der Selenomethionin-Elution. Daneben wurde Selen in verschiedenen anderen Fraktionen nachgewiesen.

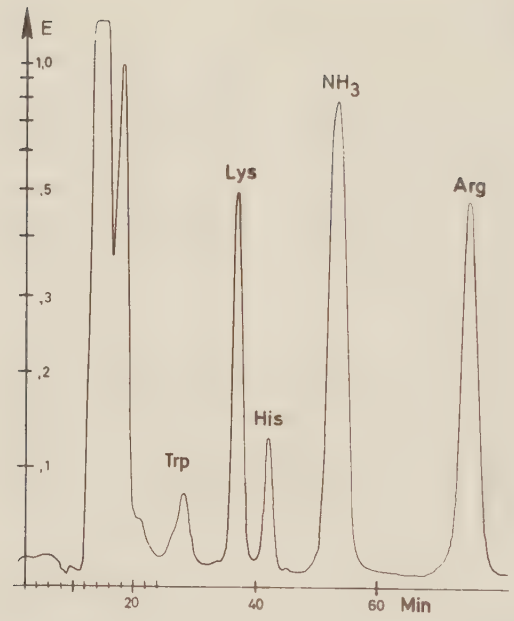
Der Selengehalt in den ersten Fraktionen der kurzen Säule (vgl. Abb. 28b) bestätigte, daß in den aufgetrennten Hydrolysaten nur noch etwa 20-30% der erwarteten Selenmenge enthalten war. Die Selenverluste dürften vermutlich während der Hydrolyse, möglicherweise auch beim Einengen der Fraktionen vor der Neutronenaktivierung entstanden sein.

Abb. 28: Zur Selenanalyse von GSH-Peroxidase nach p-Toluolsulfonsäure-Hydrolyse: Eluat der kurzen Austauschersäule

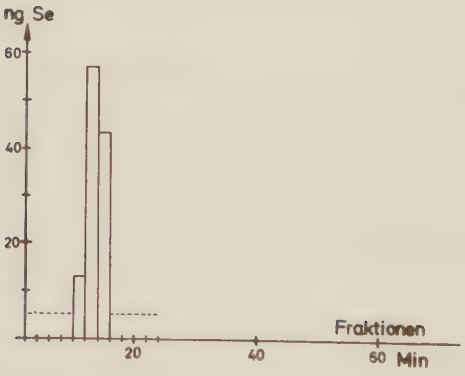
a) Ninhydrin-positives Material (aufgetragen: 2,5 nMol Enzymhydrolysat); die auf Selen analysierten Fraktionen sind auf der Abszisse markiert

b) Selengehalt einiger Fraktionen der selben Hydrolysat-Auftrennung;
------ Erfassungsgrenze der Selenanalyse

Abb.: 28


E
1,0
,5
,3
,2
,1
Trp
Lys
His
NH_3
Arg
20
40
60 Min

a)

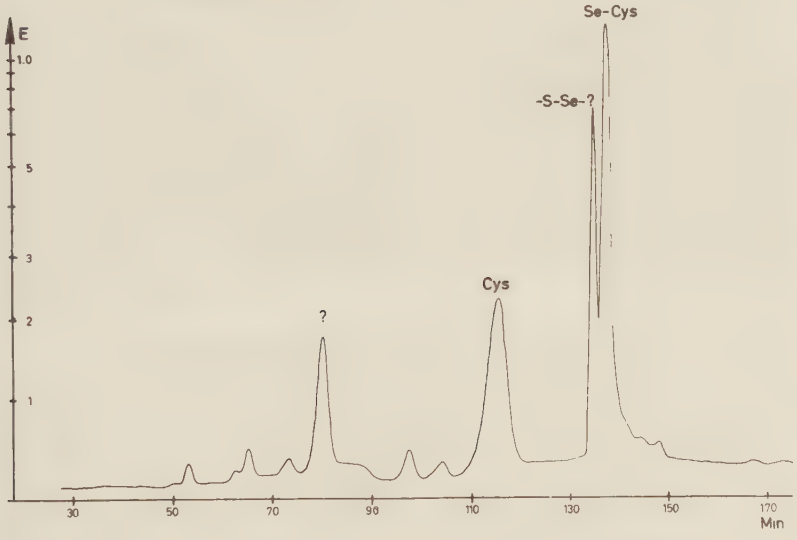

ng Se
60
40
20
Fraktionen
20
40
60 Min

b)

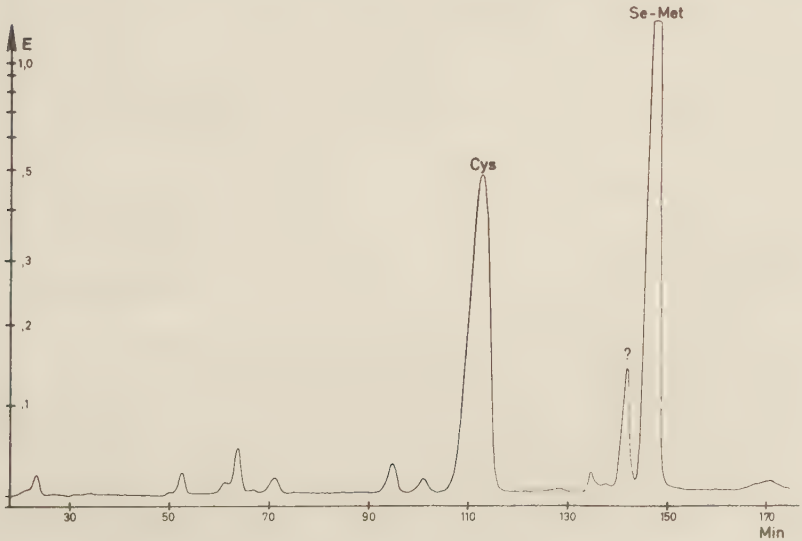
Abb. 29: Gemisch von Selenoaminosäuren mit Cystein analysiert nach Inkubation bei neutralem pH und 24 h p-Toluolsulfonsäure-Hydrolysebehandlung

a) Selenocystin/Cystein (eingesetztes molares Verhältnis 1:2)

b) Selenomethionin/Cystein (eingesetztes molares Verhältnis 1:1)



a)



b)

Schwarz und Sweeney[214] berichteten, daß Selenit in ungeklärter Weise mit Schwefel-Aminosäure reagiert. Wie Abbildung 29 zeigt, wurden die Selenoaminosäuren, besonders Selenocystin, stark geschädigt, wenn sie zusammen mit gleichen Mengen an Cystein der p-Toluolsulfonsäure-Hydrolyse unterworfen wurden.

Bei der Hydrolyse von GSH-Peroxidase dürften solche Veränderungen vermutlich in weitaus größerem Ausmaß stattgefunden haben. Es scheint deshalb unzulässig, vom gleichartigen Elutionsverhalten von Selen im Hydrolysat von GSH-Peroxidase und von Vergleichslösungen getrennt behandelter Selenoaminosäuren auf die Selenbildung in nativem Enzym zu schließen. Die Frage nach der selenhaltigen Komponente in Glutathionperoxidase bleibt daher vorläufig ungeklärt.

4. DISKUSSION

4.1. Kinetischer Mechanismus von Glutathionperoxidase

Wichtige Hinweise auf die einzelnen Reaktionsschritte der Enzymkatalyse vermittelt die Analyse kinetischer Untersuchungen. Dazu werden die gemessenen Abhängigkeiten der enzymatischen Umsatzgeschwindigkeit von den Konzentrationen der beteiligten Substrate mit theoretisch abgeleiteten Modellen verglichen. Unter günstigen Voraussetzungen können auf diese Weise denkbare Reaktionsschritte ausgeschlossen werden. Da es sich bei den vereinfachten Reaktionsfolgen um praktisch oft schwer abgrenzbare Spezialfälle allgemeiner Reaktionsmodelle handelt, scheint es wünschenswert, den postulierten Enzymmechanismus an unabhängig gewonnenen Befunden auf seine Gültigkeit zu überprüfen.

In der kinetischen Untersuchung von Flohé und Mitarbeitern an Rinder-Glutathionperoxidase mit GSH und Wasserstoffperoxid[73] als Substraten ergaben sich parallele Abhängigkeitsgeraden im doppelt reziproken Diagramm. Dadurch konnte die enzymatische Reaktionsfolge mit einem Ping-Pong-Mechanismus beschrieben werden[38]. Das Prinzip dieses Reaktionsmodells besteht darin, daß die einzelnen Substrate als Reaktionspartner spezieller Enzymformen anzusehen sind, deren Affinität jeweils nur ein Substrat betrifft. Die katalytische Funktion von Glutathionperoxidase kann deshalb in zwei unabhängige Abschnitte gegliedert werden:

1. die Oxidation der reduzierten Enzymform durch das Akzeptor-Hydroperoxid und

2. die Reduktion des oxidierten Enzyms durch den Donor GSH.

Drei unabhängige Befunde sind geeignet, diese Vorstellungen zu stützen. Als erster Hinweis auf zwei unterschiedliche Enzymformen konnte das schon länger vorliegende Ergebnis einer Gleichgewichtschromatographie von Glutathionperoxidase mit radioaktiv markiertem GSH gewertet werden[69]. Bei der Gelchromatographie des mit (^{14}C)-GSH vorinkubierten Enzyms über

eine mit (^{14}C)-GSH äquilibrierte Sephadex-Säule konnte keine Bindung des Donorsubstrats festgestellt werden, wie sie angesichts der hohen Donorsubstratspezifität des Enzyms zu erwarten gewesen wäre. Das unter den Versuchsbedingungen reduzierte Enzym sollte sich daher von der oxidierten Enzymform durch seine geringe Affinität zum Donorsubstrat GSH unterscheiden.

Zwei weitere Argumente für einen Ping-Pong-Mechanismus von Glutathionperoxidase-Reaktion steuert die vorliegende Arbeit bei. Die Hemmung des Enzyms durch Jodacetat wird nur erklärbar, wenn zwei unterschiedlich reaktive Enzymformen angenommen werden. Die quantifizierbare Selektivität, mit der nur das GSH-vorinkubierte Enzym gehemmt wird, könnte ungeachtet der Art der modifizierten Gruppierung zur Bestätigung zweier unterscheidbarer Enzymformen genügen. Die Aussage wird jedoch im Sinne des kinetischen Modells dadurch ergänzt, daß die Hemmbarkeit durch Zusatz von Akzeptorsubstrat aufzuheben war.

Die kinetische Untersuchung mit verschiedenen Hydroperoxiden bestätigt schließlich das vorgeschlagene Ping-Pong-Reaktionsmodell nicht nur durch die jeweils parallelen Abhängigkeitsgeraden bei zwei GSH-Konzentrationen. Die identischen scheinbaren Maximalgeschwindigkeiten mit verschiedenen Hydroperoxiden können als Beweis dafür gelten, daß weder Struktur noch Reaktivität der zur Enzymoxidation verwendeten Akzeptormoleküle die GSH-abhängige Enzymreduktion beeinflussen. Für die Enzymreaktion scheidet damit jeder Komplex zwischen Enzym und beiden Substraten aus.

Die allgemeine Geschwindigkeitsgleichung der von Glutathionperoxidase katalysierten Reaktion: A + 2 B $\longrightarrow$ C kann unter diesen Voraussetzungen weitgehend vereinfacht und nach Dalziel wie folgt formuliert werden[42, 43]:

$$\text{(Gleichung 1)}\quad \frac{[E_o]}{v} = \phi_o + \frac{\phi_1}{[A]} + \frac{\phi_{2a}}{[B]} + \frac{\phi_{2b}}{[B]} + \frac{\phi_{2a,2b}}{[B]^2}$$

$\left[\frac{E_o}{v}\right]$ = eingesetzte Enzymkonzentration / Umsatzgeschwindigkeit

$[A]$ = Akzeptorsubstratkonzentration

$[B]$ = Donorsubstratkonzentration

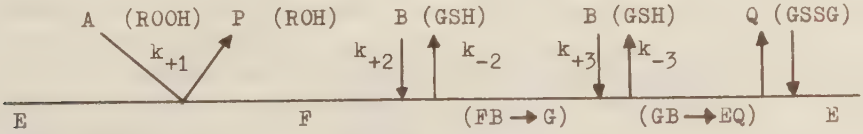
$\phi_{o,\ 1,\ 2a,\ 2b}$ = kinetische Koeffizienten

Die kinetischen Untersuchungen zeigten weiterhin, daß die ermittelten Maximalgeschwindigkeiten und die K_m^A -Werte der GSH-Konzentration direkt proportional und somit nicht limitiert waren. Die Reaktion von GSH-Peroxidase folgt damit einem Spezialfall des Ping-Pong-Modells, bei dem keine Enzym-Substrat-Komplexe kinetisch in Erscheinung treten. Unter diesen Verhältnissen entfallen in Gleichung 1 die Summanden ϕ_o und $\phi_{2a,2b}/[B]^2$. Zur Beschreibung der Reaktionskinetik von GSH-Peroxidase genügt daher die Dalziel-Gleichung:

$$\frac{[E_o]}{v} = \frac{\phi_1}{[A]} + \frac{\phi_{2'}}{[B]} \quad . \quad \text{(Gleichung 2)}$$

Eine anschauliche Darstellung der Reaktionsfolge der Glutathionperoxidase-Reaktion wurde nach Cleland[38] formuliert[73, 76]:

(Schema 2)



Die reduzierte Enzymform E wird durch Hydroperoxid zu F oxidiert. Diese Enzymform wird sukzessiv mit GSH zu E reduziert. Die beiden Reaktionsabschnitte sollen nun getrennt betrachtet werden.

4.1.1. Reaktion von GSH-Peroxidase mit Akzeptorsubstrat

Da die kinetische Studie mit verschiedenen Akzeptorsubstraten keinen Hinweis auf eine kinetisch relevante Enzym-Akzeptor-Bindung erbringen konnte und außerdem ein ungewöhnlicher Mangel an Spezifität auffällt, braucht für diesen Reaktionsschritt keine spezifische Enzym-Substrat-Bindung angenommen zu werden. Aus den reziproken $\emptyset_1$-Werten wurde unmittelbar die Geschwindigkeitskonstante k_{+1} zugänglich. Die höchsten Werte für k_{+1} mit H_2O_2 als Akzeptor lagen bei 1,8 x 10^8 M^{-1}x sec^{-1};[73] mit t-Butylhydroperoxid wurden immerhin noch 7,5 x 10^6 M^{-1} x sec^{-1} erzielt. Selbst wenn auf Grund der "active-site-Titration" die Wechselzahlen (catalytic center activity) nur bei 1/4 der angegebenen Werte für k_{+1} liegen, dürfte damit zu rechnen sein, daß die Oxidation reduzierter Glutathionperoxidase durch die Diffusion des Akzeptors an den Reaktionsort im Enzymmolekül und die sterische Zugänglichkeit der Hydroperoxidgruppe im Substratmolekül bestimmt wird. Ein einheitlicher Bindungsmechanismus für so unterschiedliche Substrate wie Wasserstoffperoxid und peroxidierte Nukleinsäure[35] war ohnehin schwer vorstellbar. Die Abstufung der Geschwindigkeitskonstanten k_{+1} bei Verwendung verschiedener Hydroperoxide entsprach damit erwartungsgemäß der Reaktivität dieser Moleküle in der Spontanoxidation von GSH.

Möglicherweise muß die Allgemeingültigkeit dieser Vorstellung zum ersten Teilschritt der Glutathionperoxidase-Reaktion in einigen Fällen eingeschränkt werden. Der Befund von Little[138], daß Cholesterol-25-hydroperoxid von Cytochrom P 450, nicht aber von GSH-Peroxidase aus Schweineblut umgesetzt wurde, bedeutet offenbar, daß dieses stark hydrophobe Substrat mit seiner Hydroperoxid-Gruppe nicht, oder nur äusserst schwer, an die reaktive Gruppierung von GSH-Peroxidase gelangt. Obwohl diese Untersuchung bei pH 8 und an Schweine-Glutathionperoxidase durchgeführt wurden, bestätigt sie insofern die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse, als sich die Abhängigkeitsgeraden von Wasserstoffperoxid, Cumol- und Progesteron-17 -Hydroperoxid auf eine gemeinsame Maximalgeschwindigkeit extrapolieren lassen.

Der Vergleichbarkeit dieser Ergebnisse sind nicht nur wegen der Verwendung verschiedener Enzymarten sondern möglicherweise auch wegen der verschiedenen pH-Werte Grenzen gesetzt. Offenbar wirkt sich für das Akzeptorsubstrat eine pH-Erhöhung von pH 6,7 auf 7,7 begünstigend auf die Zugänglichkeit des reaktiven Zentrums des Enzyms aus.

Von der Möglichkeit, Wasserstoffperoxid gegen das reaktionsträgere und selektivere t-Butylhydroperoxid ohne Benachteiligung der enzymatischen Reaktion auszutauschen, wurde bei der Quantifizierung der "active sites" von GSH-Peroxidase und bei der Bestimmung dieses Enzyms in Hämolysat[98] Gebrauch gemacht.

4.1.2. Reaktion von GSH-Peroxidase mit Donorsubstrat

Im Gegensatz zur Reaktion zwischen Enzymmolekül und Akzeptorsubstrat ist bei der ausgeprägten Donorsubstratspezifität von Glutathionperoxidase eine Komplexbildung zwischen Enzym und GSH im Zuge der Enzymreduktion zu erwarten. Aus den kinetischen Untersuchungen geht jedoch hervor, daß dieser Komplex nicht als ternäres Anlagerungsprodukt FB_2 angesehen werden kann, und daß die binären Zwischenformen auch während der Reaktion nicht akkumulieren. FB und GB müssen deshalb als schnell umgesetzte Übergangsformen angesehen werden, deren Zerfall in die Ausgangsbestandteile vernachlässigbar ist.

Außer diesen Schlüssen sind über die reduktive Phase der Reaktion wenig Aussagen möglich. Vielleicht wird während der ersten Phase der photooxidativen Inaktivierung des Enzyms die GSH-Bindung beeinträchtigt. Signifikant ist zumindest, daß in dieser Phase das spezifische Donorsubstrat GSH relativ schlechter umgesetzt wird als der unphysiologische Donor Mercaptoessigsäuremethylester.

Keine solchen Unterschiede konnten in der pH-Abhängigkeits-Studie unter Akzeptorsättigungsbedingungen festgestellt werden. Die Donorsubstratkonzentration B in Gleichung 2 kann deshalb nicht der RS^--Konzentration gleichge-

setzt werden. Die Reaktivitätssteigerung zwischen pH 6,7 und 7,7, wie sie sich in einem erniedrigten $\emptyset_2$-Wert ausdrückt, muß deshalb überwiegend auf Vorgänge am Enzymmolekül zurückgeführt werden.

In diesem Zusammenhang sei noch darauf hingewiesen, daß offenbar zwischen zwei Vorgängen bei der Inkubation von Glutathionperoxidase mit GSH differenziert werden muß:

1. der Reduktion zur Enzymform E und
2. der vermutlich ebenfalls reduktiven Aktivierung des Enzyms[137, 96].

Die Enzymreduktion im Zuge der enzymatischen Reaktion erwies sich als hoch spezifisch auf GSH und trat deshalb bei der Donorsubstratspezifitätsstudie und bei den oben erwähnten Unterschieden in der photooxidativen Inaktivierung umsatzlimitierend in Erscheinung. Gleichfalls auf diese Art der Enzymreduktion muß die GSH-Vorbehandlung des Enzyms vor der Jodacetat-Inaktivierung zurückzuführen sein, da die Hemmung durch stöchiometrische Hydroperoxidmengen wieder aufgehoben werden konnte.

Die GSH-Vorinkubation im Sinne einer Enzymaktivierung umfaßt hingegen wenig geklärte Prozesse[96]. Diese sind offenbar von der RS^--Konzentration abhängig und könnten als Reduktion oxidativ veränderten Enzyms angesehen werden. In dieser Richtung dürfte auch die stabilisierende Wirkung von GSH auf Glutathionperoxidase zu verstehen sein.

4.2. Katalytische Vorgänge am Glutathionperoxidase-Molekül

Die katalytische Funktion von Glutathionperoxidase ist auf Grund des kinetischen Verhaltens nicht darin zu sehen, daß die Substrate, in günstiger Position am Enzymmolekül fixiert, miteinander zur Reaktion gebracht werden. Das Enzymmolekül ist vielmehr unmittelbar als Reaktant an der Umsetzung der Substrate beteiligt. Damit ist die katalytische Eigenschaft in besonderem Maß an die Beschaffenheit des Enzymmoleküls gebunden und die Veränderungen, die es im Verlauf der Reaktion erfährt, sind für das Verständnis des enzymatischen Reaktionsverhaltens von großer Bedeutung.

4.2.1. Hinweise auf essentielle Gruppen für die Enzymaktivität

Bei der Betrachtung der katalytischen Vorgänge am Enzymmolekül kann zwischen einem reaktiven Zentrum und einem übergeordneten aktiven Bereich unterschieden werden. Der erste Begriff könnte im Falle der Glutathionperoxidase der redoxaktiven Gruppierung gleichgesetzt werden. Der aktive Bereich würde darüberhinaus noch Gruppen des Enzymmoleküls umfassen, die sich z.B. über die Donorsubstratbindung oder die Stabilisierung der Enzymkonformation auf die Aktivität auswirken könnten. Die Abgrenzung des aktiven Bereichs ist jedoch erschwert, weil der konformative Einfluß einzelner Gruppen des Enzyms zunächst nicht näher spezifiziert werden kann.

Daß konformative Einflüsse die Enzymaktivität mitbestimmen können, scheint aus der pH-Abhängigkeit der Umsatzraten hervorzugehen. Eine pH-Verschiebung wirkt sich auf beide kinetischen Koeffizienten aus und zeigt damit an, daß beide Reaktionsabschnitte der Enzymkatalyse betroffen werden. Das pH-Profil der enzymatischen Reaktion unter Akzeptorsubstratsättigung deutet auf mehrere Gruppen des Enzymmoleküls hin, die durch ihre Ladungsveränderungen auf nicht näher erklärbare Weise die Reaktivität der oxidierten Enzymform gegenüber Thiolen beeinflußt.

Prägnantere Vorstellungen über die nähere Umgebung des reaktiven Zentrums vermittelte die Analyse der Donorsubstrat-Spezifität des Enzyms[68]. Auf Grund dieser Ergebnisse können zwei geladene Gruppen am Enzymmolekül unterschieden werden:

1. eine positiv geladene Gruppe zur Orientierung des γ-Glutamyl-Carboxylats und
2. eine positiv gelandene Gruppe in unmittelbarer Umgebung der Enzymgruppe, die mit dem Donor-SH reagiert.

Für die erste Ladung spricht die aktivitätsfördernde Wirkung eines γ-Glutamylrests am Donorthiol. Da Asparthion nur noch in sehr geringem Maß von GSH-Peroxidase umgesetzt wird, scheint diese Donor-Enzym-Bindung stark von den räumlichen

Verhältnissen abhängig zu sein. Auf die zweite positive Ladung konnte über die verringerte Aktivität ungeschützter Aminothiole geschlossen werden. Sie dürfte damit in unmittelbarer Nähe des reaktiven Zentrums liegen.

Es stellte sich die Frage, ob die Hemmversuche mit gruppenspezifischen Modifikatoren diese Ladungen bestätigen oder näher spezifizieren könnten. Bei der Bewertung dieser Untersuchungen mußte jedoch beachtet werden, daß die Reaktivität und Auswirkung dieser Modifikatoren auf das Makromolekül GSH-Peroxidase aus Materialmangel nur an der enzymatischen Aktivität überprüft wurde. Trotzdem darf angenommen werden, daß die Donorsubstratspezifität von der Photooxidation betroffen wurde. Die pH-Abhängigkeit der strahlungsbedingten Reaktivitätsabnahme schließt eine Beteiligung von Histidin an der enzymatischen Reaktion aus, wenn vorausgesetzt wird, daß unter den Bestrahlungsbedingungen das ohnehin nur in wenigen Exemplaren vertretene Imidazolderivat signifikant hätte geschädigt werden müssen. Die pH-Abhängigkeit der Hemmwirkung von Tetranitromethan scheint mit ihrem Anstieg über pH 8 auf einen essentiellen Tyrosinrest des Enzymmoleküls hinzuweisen. Es bleibt jedoch noch die Möglichkeit zu erwägen, ob nicht eine pH-bedingte Konformationsänderung die Modifizierung erleichterte. Davon abgesehen erhebt sich die Frage, welche Rolle Tyrosin im aktiven Bereich zufallen könnte und ob mit dieser Modifikation nicht nur ein reaktionsunbeteiligtes Strukturelement betroffen wurde.

Die Hemmung von GSH-Peroxidase durch Jodacetat zeigte dagegen in ihrer Selektivität und schnellen Wirkung Eigenschaften, die geeignet erschienen, auf die Verhältnisse im reaktiven Bereich zurückzuschließen. Da Jodacetat speziell reduzierte GSH-Peroxidase angreift, muß seine Reaktionsweise eng mit dem Zustand des aktiven Bereichs zusammenhängen. Eine ähnliche Abhängigkeit wurde von Flohé bei der Hemmung von Glutathionperoxidase durch Quecksilber-(II)-Ionen festgestellt[60, 204]. Möglicherweise wurde wegen dieser Spezifität für die reduzierte Enzymform keine Jodacetat-Hemmung an dem Enzym aus Schweineblut festgestellt[135].

Der Befund, daß reduzierte GSH-Peroxidase unter den Versuchsbedingungen in starkem Maße von Jodacetat, dagegen kaum von Jodacetamid oder β-Propiolacton gehemmt wurde, könnte auf eine unterschiedliche Reaktivität der Alkylierungsmittel oder auf die Ladung des Jodacetat-Anions zurückgeführt werden. Für die erste Möglichkeit scheint zunächst zu sprechen, daß Rinderpankreas-Ribonuklease bevorzugt durch Jodacetat inaktiviert wird[244]. Die Selektivität, mit der in diesem Fall ein Histidinrest des Enzyms von Jodacetat alkyliert wurde, war jedoch von der nativen Konformation des Enzyms abhängig. In Guanidiniumchlorid reagierte Ribonuklease A mit Jodacetat und Jodacetamid weit weniger unterschiedlich als in Pufferlösung. Mit der Ladung von Jodacetat wird auch die pH-Abhängigkeit der Alkylierung gedeutet, die um pH 5,5 ein Maximum durchläuft. Die Autoren vermuten[244, 99], daß in diesem pH-Bereich eine Kooperation zweier Histidinreste von Ribonuklease A in Erscheinung tritt: Während ein Histidinrest mit niedrigem pK-Wert alkyliert wird, soll das Histidinium-Ion des anderen die Fixierung des Jodacetat-Anions übernehmen. Bei niedrigen pH-Werten würden beide Imidazolreste geladen und damit nicht alkylierbar vorliegen, während im alkalischen Bereich die Orientierung des Alkylierungsmittels entfallen würde.

Eine ähnliche Untersuchung der Jodacetat-Hemmung an Ribonuklease T_1 ergab zunächst ein durchaus entsprechendes Bild[246]. Wiederum war Jodacetat weitaus effektiver bei der Enzymaktivierung als sein Amid und wiederum ergab sich ein pH-Optimum der Alkylierung bei pH 5,5. Die Analyse des modifizierten Proteins zeigte jedoch, daß in diesem Fall die γ-Carboxylgruppe eines Glutamylrests verestert worden war. Für die Selektivität der Alkylierung wurde wie im oben zitierten Fall ein Histidinrest verantwortlich gemacht. Es kann also angenommen werden, daß die bevorzugte Reaktivität von Jodacetat in hohem Maß von einer positiven Ladung in der Nähe der alkylierbaren Gruppe des Proteins abhängt. Durch die Fixierung des Alkylierungsmittels können ungewöhnliche Reaktionsweisen bevorzugt werden. In Ribonuklease A wurde Histidin an N-1 des Imidazolrings carboxyliert, während

freies α-N-Acetylhistidin an N-3 modifiziert wurde[244]. Die Carboxymethylierung einer Carboxylgruppe wie im Falle von Ribonuklease T_1 war ohne Beispiel[246].

Die Jodacetat-Hemmung von GSH-Peroxidase gleicht den beiden beschriebenen Fällen nicht nur in ihrer Spezifität sondern auch in ihrer pH-Abhängigkeit. Die Verringerung der Inaktivierungsgeschwindigkeit zwischen pH 6,4 und 8,9 sollte in gleicher Weise auf eine Dissoziation einer positiv geladenen Gruppe zurückzuführen sein. Der Kurvenverlauf würde wie in den oben erwähnten Fällen die Beteiligung einer Histidin-Imidazolium-Gruppe nahe legen. Nach den Ergebnissen der photooxidativen Hemmung sollte einer Histidingruppe jedoch selbst keine wesentliche Bedeutung im Reaktionsgeschehen zukommen. Ob diese Ladung mit der identisch sein könnte, die auf Grund der Donorsubstratspezifitäts-Studie in der Nachbarschaft des reaktiven Zentrums angenommen wurde, ist ungewiß. Als weitere Indizien für eine solche Ladung kann die Hemmwirkung von polyvalenten Anionen wie Phosphat[64], Sulfat[64] oder Nukleotiden[136] angesehen werden. In diese Kategorie von Inhibitoren kann möglicherweise auch der Quecksilber-(II)-EDTA-Komplex eingeordnet werden, bei dem Hg^{2+} offenbar bevorzugt von den Stickstoff-Atomen komplexiert wird, die Carboxylatgruppen dagegen frei sind[60, 204]. Dieser Komplex erwies sich im Gegensatz zu seinen Bestandteilen als sehr effektiver Inhibitor von GSH-Peroxidase[60, 204].

Während auf diese Weise die Existenz mehrerer positiven Ladungen im aktiven Bereich von GSH-Peroxidase belegt zu sein scheint, kann noch nicht definitiv entschieden werden, welche Gruppe des Enzyms von Jodacetat alkyliert wird. Der Alkylierungsvorgang erfordert einen nukleophilen Angriff von der alkylierbaren Gruppe. Das Alkylierungsmittel könnte damit als Konkurrent des Hydroperoxids in der nukleophilen Substitutionsreaktion zwischen reduziertem Enzym und Akzeptorsubstrat aufgefaßt werden.

4.2.2. Vorstellungen zum reaktiven Zentrum von GSH-Peroxidase

Mit der Feststellung, daß Glutathionperoxidase weder ein Cytochrom-[165, 135, 204] noch ein Flavin-System[60, 135] enthält, schieden die Coenzyme aller bekannten Peroxidasen zur Erklärung der Katalyse des hier untersuchten Enzyms aus. Ein Radikalmechanismus, wie er für Meerrettichperoxidase angenommen wird, ist für GSH-Peroxidase unwahrscheinlich, weil die enzymatische Reaktion, stöchiometrisch exakt, ein definiertes Produkt liefert. Der Beteiligung von Metallionen am Reaktionsmechanismus steht entgegen, daß die enzymatische Aktivität durch Komplexbildner nicht verringert wurde[204] und daß das Absorptionsspektrum des reinen Enzyms im sichtbaren Bereich leer ist[69].

Ein reaktionsmechanistisches Modell, das die chemischen Vorgänge der Enzymkatalyse von GSH-Peroxidase allein mit den normalen Proteinbestandteilen beschreibt, wurde von Schneider und Flohé vorgeschlagen[204]. Danach sollten zwei räumlich benachbarte Cystein-Thiol-Gruppen des Enzyms durch den Akzeptor zum Disulfid oxidiert werden. In einem Thiol-Disulfid-Austausch sollte darauf das oxidierte Enzym in zwei Schritten durch GSH wieder in die reduzierte Dithiol-Form überführt werden. Als Hinweise für die Beteiligung von Thiol- und Disulfid-Gruppen wurde die Hemmung des Enzyms durch p-Chlormercuribenzoat (pCMB), durch Sulfit und durch Quecksilber-(II)-Ionen gewertet. Eine Bestätigung der Hypothese wurde darin gesehen, daß sich durch Vorinkubation mit GSH die Anzahl der durch pCMB markierten Reste am Enzym etwa verdoppeln ließ[69].

Das Dithiol-Disulfid-Modell konnte zwar den Reaktionsverlauf der Katalyse von GSH-Peroxidase anschaulich erklären. Zweifel an der formulierten Reaktionsfolge erwuchsen aus der hohen Reaktionsgeschwindigkeit, mit der besonders reduziertes Enzym und Hydroperoxide reagierten. Die Reaktionsneigung von GSH und Hydroperoxiden, die schon spontan unter normalen Testbedingungen nicht unerheblich war, sollte

durch die Enzymkatalyse erheblich gesteigert werden. Es wurde deshalb angenommen, daß eine positive Ladung nahe der reaktiven SH-Gruppe deren Dissoziation (oder die des reduzierenden Thiols) zu einem nukleophilen Sulfid-Anion erzwingen könnte[69]. Jedoch übersteigt die enzymatische Reaktion die Reaktionsneigung von Peroxiden mit Thiolaten erheblich.

Selen als Bestandteil von GSH-Peroxidase wäre geeignet, die Frage nach dem Mechanismus der Enzymkatalyse der Lösung näher zu bringen. Die qualitative Anwesenheit dieses Spurenelements konnte angesichts einer möglicherweise unspezifischen Bindung noch nicht als Hinweis auf eine Beteiligung von Selen am Mechanismus gewertet werden. Die Möglichkeit, daß Selen das Enzym durch Induktion seiner Synthese beeinflussen könnte[273, 251], beschränkte die Aussagekraft der vergleichenden Untersuchungen an Se-supplementierten und Se-Mangel-Ratten[198, 199]. Mit den Feststellungen jedoch, daß in einem Molekül Glutathionperoxidase 4 Selenatome enthalten sind, und daß das Enzym bei 4 Untereinheiten[67] 4 reaktive Zentren aufweist, ist ein gewichtiger Hinweis auf eine Beteiligung von Selen am enzymatischen Redoxprozess gegeben. Die Frage, ob Selen in GSH-Peroxidase seinen Redoxzustand ändert, bleibt letztlich noch ungeklärt. Als Indizien für eine Beteiligung von Selen am enzymatischen Redoxprozess können die gemeinsamen antioxidativen Eigenschaften des Enzyms und des Spurenelements gelten. Die bemerkenswerte Fähigkeit von Selenverbindungen, die Oxidation von Thiolen zu katalysieren[121], wurde mehrfach beschrieben.

Einige dieser Fälle sind in Tabelle 8 zusammengestellt:

Tabelle 8: Beispiele für selenkatalysierte Thioloxidationen nach der allgemeinen Reaktion:

$$2\ R\text{-}SH + X \xrightarrow{(Selen)} R\text{-}S\text{-}S\text{-}R + XH_2$$

katalytische Selenverbindung	Donor (R-SH)	Akzeptor (X)	Zitat
Selenit	GSH, Cystein, Homocystein	Methylenblau	243
Selenit, Selenocystin	GSH	Cytochrom c (oxidiert)	134
Selenit	GSH	O_2	258
Selenocystin	GSH, Cystein, Homocystein	H_2O_2, O_2, Hydroperoxide	27
Selenocystin	GSH, Cystein	Prot-S-S-R	50
	Prot-SH	O_2	

Über die Form, in der Selen in Glutathionperoxidase gebunden vorliegt, können auch nach den vorläufigen Untersuchungen dieser Arbeit keine definitiven Aussagen gemacht werden. Auf Grund der Eigenschaften des Enzyms können über die Selenkomponente jedoch folgende Aussagen gemacht werden:

1. Sie ist hinreichend stabil, um die 6 bis 8 Wochen dauernde Enzympräparation und die dabei angewandten Trennverfahren zu überdauern. Es kann daher angenommen werden, daß Selen in GSH-Peroxidase kovalent gebunden vorliegt. Die Selenotrifulfid-Bindung ist weder mit der Stabilität des Enzyms im neutralen oder schwach alkalischen pH-Bereich, noch mit der Tatsache zu vereinbaren, daß Glutathionperoxidase durch Donorthiole geschützt und nicht geschädigt wird.

2. Sie zeigt keine Absorptionsbanden oberhalb 300 nm und im sichtbaren Bereich. Selen-Metall-Komplexe dürften sich hingegen in dieser Region im Spektrum bemerkbar machen[247,257]. Außerdem fehlen weitere Hinweise auf die Anwesenheit von Metallionen im Enzymmolekül.

Nach Supplementation von Ratten mit Selenit wurde Selen in GSH-Peroxidase eingebaut[199]. Obwohl es an Hand der bisherigen Vorstellungen zum Selenstoffwechsel schwerfällt, einen Umbau von Selenit in Selenoaminosäuren zu erklären (vgl. 1.2.3.1.2.), sind Selenocystin, Selenomethionin und ihre Derivate als Selenkomponenten von Glutathionperoxidase besonders zu erwägen. Einerseits wurde das Vorkommen dieser Substanzen in biologischem Material nachgewiesen (vgl. 1.2.3.2.), andererseits sind sie geeignet, als Modelle für hypothetische Enzymmechanismen zu dienen.

Bevor drei Reaktionsmodelle vorgestellt werden, wie sie bei einer Beteiligung von Selenoaminosäuren an der Katalyse von GSH-Peroxidase denkbar wären, sollen die mechanistischen Anforderungen zusammengefaßt werden, denen diese Modelle gerecht werden sollten. Für die Enzymformen von Schema 2 ergeben sich folgende charakteristische Eigenschaften:

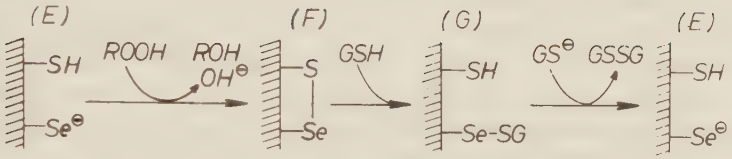
(E): Gruppe mit hohem Elektronenüberschuß, fähig zu sehr schnellem Angriff auf Hydroperoxid (oder Jodacetat); in Lösung leicht zu (F) oxidiert, in Gegenwart von GSH dagegen stabil; bindet kein GSH.

(F): entsteht aus (E) durch Abgabe von zwei Elektronen; in Lösung relativ stabil; kann oxidativ geschädigt werden (partiell reversibel durch RS^-); reagiert mit GSH geschwindigkeitslimitierend, (von Jodacetat nicht angegriffen, möglicherweise von Hg^{2+}-EDTA inaktiviert).

(G): entsteht aus (F) und GSH und ist als labile Zwischenstufe bei der Regeneration von (E) aufzufassen; reagiert mit GSH und setzt leicht GSSG frei.

Ausgehend von den mechanistischen Vorstellungen von Schneider und Flohé[204] sei zunächst ein Reaktionsmodell vorgestellt, in dem eine der Thiolgruppen durch einen Selenorest, entsprechend einem proteingebundenen Selenocystein, ersetzt ist.

(Schema 3)

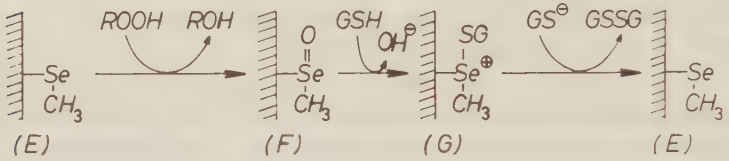


Die gegenüber seinem Schwefelanalogen verstärkte Oxidationsbereitschaft von Selenocystein ist bekannt. Da Selenole wesentlich stärkere Säuren darstellen als Thiole, liegt Selenocystein unter physiologischen Bedingungen disoziiert vor (pK_{SeH}= 5,24)[112]. Selenocystein reagiert mit Jodacetamid oder Jodacetat, möglicherweise durch Katalyse des Aminosäure-Carboxylats, schon bei pH-Werten unterhalb des pK_{SeH}[112]. Die maximale Geschwindigkeit der Carboxymethylierung mit Jodacetat ist mehr als doppelt so hoch wie die der Alkylierung mit Jodacetamid[112]. Die Reduktion von Selenocystin und damit auch von Monoselenocystin durch Thiole wird von Dickson und Tappel beschrieben[49]. Danach wird zur Reduktion von Selenocystin unter physiologischen Verhältnissen ein 1000facher Überschuß an GSH benötigt. Im Gewebe sollte GSH-Peroxidase auch nach diesem Modell reduziert vorliegen. Für die Enzymform (F) wäre eine Stabilisierung im Peptidverband zu fordern, die eine weitere Oxidation durch Hydroperoxid verhindert (vgl. l.c.[27] und Schema 5). Von $R\text{-}Se^-$ als starkem Chromophor wäre zwischen 240 und 250 nm eine Extinktion von etwa 0,2 für eine Lösung von 1 mg GSH-Peroxidase/ml zu erwarten[128]. Der Extinktionsbeitrag des Sulfoselenyl-Rests dürfte niedriger ausfallen und bei etwa 285 nm zu suchen sein[128].

Eine interpretatorische Schwierigkeit geht von dem Dithiol-Disulfid-Modell auch auf diese Reaktionshypothese über. Der schnelle Oxidationsschritt muß in diesem Reaktionsmechanismen jeweils eine Bindung zwischen zwei Enzymgruppen herstellen, ein Vorgang, der nicht leicht mit den Umsatzgeschwindigkeiten zu vereinbaren scheint. Dieser Schritt wäre leich-

ter verständlich, wenn ein Mechanismus angenommen wird, an dem wie in Schema 4 oder 5, keine Bindungen zwischen zwei Enzymgruppen beteiligt sind:

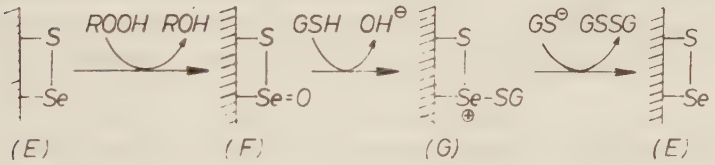
(Schema 4)



Als Indizien für dieses Modell kann angeführt werden, daß Selenomethionin erfolgreich zum Oxidationsschutz von Fetten eingesetzt wurde[179]. Eine schnelle Reaktion von Selenomethionin mit Hydroperoxid zu einem allerdings nicht identifizierten Produkt beschrieben Caldwell und Tappel[26]. Möglicherweise könnte es sich hierbei um ein Selenanaloges von Dehydromethionin handeln, einem zyklischen Kondensationsprodukt zwischen Sulfoxid- und freier α-Aminogruppe des oxidierten Methionins[130]. Auf ähnliche Weise könnte in diesem Reaktionsmodell die Selenoxidform (F) vorliegen, wenn in ihr die stabilere, oxidierte Enzymform gesehen werden soll. Als Hinweis auf eine weitere Stabilisierungsmöglichkeit für Selenoxide könnte ihre Fähigkeit gewertet werden, Komplexe, z.B. mit Pyridin, zu bilden[3]. Auf die Eigenschaften der formulierten Reaktionsstufen kann über die Reaktionen von Methionin geschlossen werden. Die Oxidation von Methionin durch Hydroperoxide verläuft erstaunlich rasch und ergibt zunächst das Sulfoxid[255]. Entsprechend der weiteren Oxidation zum Sulfon könnte das Enzym inaktiviert werden. Die Reduktion von Sulfoxiden durch Thiole ist bekannt[255], verläuft aber relativ langsam. Da Selenoxid jedoch labiler ist als Sulfoxid dürfte die Reduktion hier schneller vor sich gehen[3]. Selenide sind für ihre Resistenz gegenüber alkalischen pH-Werten bekannt[2]. Die Methylgruppe kann nur schwer substituiert werden[2]. Wie Methionin reagieren Selenide leicht mit Jodacetat[232], während Sulfoxide der Alkylierung nicht zugänglich sind.

Von Caldwell und Tappel[27] wurde festgestellt, daß Selenocystin die Oxidation von Cystein, GSH und Homocystein durch Hydroperoxide beschleunigen kann. Als katalytische Zwischenstufen wurden die Oxide des Diselenids (R-Se(O)-Se-R) und des Thioselenids (R-Se(O)-S-R) angenommen. Für Glutathionperoxidase könnte nach diesem Vorbild ein dritter katalytischer Mechanismus vorgeschlagen werden, der in gewisser Weise zwischen den Reaktionsfolgen von Schema 3 und 4 steht:

(Schema 5)



Dieser Reaktionsmechanismus gründet sich auf die Bereitschaft von Thioseleniden, zu Selenolseleninat (F) aufzuoxidieren und daraus durch Thiole wieder regeneriert zu werden[27]. Die Zwischenstufen (F) und (G) sind auch in den Modelluntersuchungen nicht gesichert. Die Bildung von Selenolseleninat wird im Verlauf der Diselenid-Oxidation zu Seleninsäuren angenommen[124]. Seleninsäuren können durch Thiole zu Diseleniden reduziert werden[124]. Auf diese Weise könnte eine oxidative Enzymaktivierung bzw. die Aktivierung des Enzyms durch Thiole erklärt werden. Wenn dieser katalytische Mechanismus in GSH-Peroxidase verwirklicht sein sollte, müßten die Stufe (F) gegen eine weitere oxidative Aufspaltung, die Stufe (E) gegen eine reduktive Aufspaltung im Sinne der Reaktionsfolge (F)→(E) in Schema 3 geschützt sein.

Erwartungsgemäß sind in keinem der mechanistischen Modelle die Eigenschaften von Glutathionperoxidase so augenfällig getroffen, daß daraus Hinweise auf die Verhältnisse im reaktiven Zentrum des Enzyms abgeleitet werden könnten. Einbezogen in den Peptidverband könnten die vorgestellten Modellverbindungen jedoch in der Lage sein, die Reaktivität von Glutathionperoxidase zu erklären. Trotzdem soll die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß an der Katalyse von GSH-Peroxidase eine noch unbekannte Redoxkomponente beteiligt sein könnte.

4.3. Beziehungen zwischen dem Selengehalt und der GSH-Peroxidase-Aktivität in biologischem Material

Zum Schluß soll noch auf die biologische Bedeutung des Zusammenhangs zwischen Selen und Glutathionperoxidase eingegangen werden. Der sehr niedrige Glutathionperoxidase-Gehalt im Gehirn[161] und im Uterus[138] von Ratten könnte als eine Ursache dafür aufgefaßt werden, daß Selen keinen Einfluß auf die Encephalomalazie oder die resorptive Sterilität von Ratten ausübt (vgl. Tab. 1). Entsprechend könnte in der GSH-Peroxidase-Aktivität von Erythrocyten oder Leberzellen ein Maß für den Selen-Status dieser Gewebe gesehen werden.

Eine Reihe von Befunden weisen jedoch darauf hin, daß GSH-Peroxidase wohl eine biologisch wichtige, nicht aber die einzige funktionelle Selenkomponente der Zelle sein kann. In den Untersuchungen von Rotruck et al.[196-199] trat die glucoseabhängige Hämolyseneigung der Rattenerythrocyten erst auf, als der Selenmangel an der Rattenleber längst manifest war. In der subzellulären Verteilung in Rattenleber unterscheidet sich Selen von GSH-Peroxidase[70] besonders durch seine Anwesenheit in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums[30, 31, 51]. Der Einfluß von Selen auf Wachstum, Muskel- und Pankreasfunktion ist auch dann kaum als Auswirkung der Glutathionperoxidase-Aktivität zu verstehen, wenn berücksichtigt wird, daß das Enzym eine wichtige Oxidationsschutz-Funktion in Mitochondrien erfüllt. Nach Little[138] könnte in der Reduktion von Steroid-Hydroperoxiden eine biologische Funktion von GSH-Peroxidase gesehen werden, die den Stoffwechsel vielfältig beeinflussen könnte. Die Aktivität dieses Enzyms z.B. in Nebennierengeweben[138, 161] kann jedoch auch unter dem herkömmlichen Aspekt des zellulären Oxidationsschutzes betrachtet werden. Die Fähigkeit von Glutathionperoxidase, selbst peroxidierte DNS zu reduzieren[35], bringt dieses Enzym mit der Hypothese von Shamberger in Verbindung, in der von Selen ein antioxidativer Schutz vor Carcinogenen erwartet wird[224, 225]. Ein Zusammenhang mit GSH-POD verliert viel an Glaubwürdigkeit,

wenn berücksichtigt wird, daß in der Kernfraktion des Rattenleberhomogenats nur verschwindend geringe Aktivitäten dieses Enzyms gefunden wurden[70].

Die sehr geringen Selenkonzentrationen des menschlichen Auges, insbesondere der Retina, wurden als Indiz gegen eine Beteiligung von Selen am Sehvorgang gewertet[250, 32]. Die Feststellung darf jedoch nicht als Beweis dafür angesehen werden, daß geringe Selenmengen im Auge keine Funktion hätten. Nach dem Selengehalt der menschlichen Augenlinse von ca. 0,07 µg[250] könnte nämlich mit einer GSH-Peroxidase-Aktivität bis etwa 10 U_{37} pro Linse gerechnet werden (Annahmen: 4 Selenatome/Enzymmolekül (MG 84 000); 550 U_{37}/mg Enzym).

Der definierte Selengehalt von GSH-Peroxidase sollte es umgekehrt ermöglichen, an Hand der Enzymaktivität von Geweben auf den Anteil des Selens zu schließen, der dem Enzym zugeordnet werden muß. Zwar wurde auch in Humanblut eine starke Abhängigkeit des Selengehalts von der Ernährung festgestellt, sodaß dem Mittelwert von 20 µg Selen pro 100 ml Blut[226] keine limitierende Bedeutung zukommen kann. Eine Grenze zu Mangelerscheinungen ist jedoch bei einem Selengehalt von 10-15 µg pro 100 ml Blut gegeben. Niedrigere Werte z.B. in Fällen von Kwashiorkor konnten durch normale Ernährung wieder in diesen Bereich angehoben werden[40]. Wenn in Humanblut eine durchschnittliche GSH-Peroxidase-Aktivität von 1,5 mU_{37} pro mg Hämoglobin angenommen wird[98], so läßt sich ein enzymgebundener Selenanteil von 0,17 µg Se pro 100 ml Blut errechnen (weitere Annahmen: 16 g Hämoglobin/100 ml Blut). Da der größte Teil des Blut-Selens in den Erythrocyten lokalisiert ist[48], kann geschlossen werden, daß nur wenige Prozente des essentiellen Selengehaltes in Erythrocyten auf das in Glutathionperoxidase gebundene Selen entfallen. Andererseits demonstriert diese Kalkulation deutlich, welch geringe Mengen dieses Spurenelements notwendig sind, um als Bestandteil von Glutathionperoxidase seine Wirkung im biologischen Oxidationsschutz zu entfalten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Einleitend wurden die bisherigen Befunde über Glutathionperoxidase und deren Rolle im biologischen Oxidationsschutz kritisch gewertet. Ferner wurde eine Literaturübersicht über den Stoffwechsel von Selenverbindungen und ihre möglichen biologischen Funktionen erarbeitet.

Homogene Glutathionperoxidase aus Rindererythrocyten wurde erstmals kristallisiert. Die Farbentwicklung des hochgereinigten Enzyms in der Proteinbestimmungsmethode nach Lowry et al.[141] wurde geeicht.

Das kinetische Verhalten von GSH-Peroxidase mit den Akzeptorsubstraten Äthyl-, Cumol- und tert.-Butylhydroperoxid war mit einem "Ping-Pong-Mechanismus" zu vereinbaren. Gemeinsame scheinbare Maximalgeschwindigkeiten $V^A_{(app)}$ für die untersuchten Akzeptorsubstrate, sowie unendliche K_m- und V_{max}-Werte unterstrichen das reaktionsmechanistische Konzept eines Ping-Pong-Modells ohne zentrale Komplexe. Die Geschwindigkeitskonstanten k_{+1} der Enzymoxidation durch die genannten Akzeptorsubstrate lagen bei 31, 12,8 bzw. 7,5 x 10^6 (M^{-1} x sec^{-1}) und folgten damit der spontanen Reaktionsneigung dieser Hydroperoxide mit Thiolen.

Die pH-Abhängigkeit der enzymatischen Umsatzraten ließ sich nicht als Funktion der Donor-Thiolat-Konzentration beschreiben, sondern wurde primär Ladungsveränderungen am Enzymmolekül zugeschrieben. Durch Erhöhung des pH-Werts im Inkubationsmedium von pH 6,7 auf pH 7,7 schien sowohl die Oxidation als auch die Reduktion des Enzyms, wenn auch in unterschiedlichem Maß, beschleunigt zu werden.

Mit N-Äthylmaleinimid, β-Propiolacton, Jodacetamid, 2-Hydroxy-5-nitrobenzylbromid, Phenylglyoxal und 5-Diazo-1H-tetrazol wurden keine beziehungsweise nur eine geringe Hemmung der GSH-Peroxidase aus Rinderblut festgestellt. Erhebliche Aktivitätsverluste entstanden dagegen durch Behandlung mit p-Chlormercuribenzoat, 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoat), 4,4'-Dithiodipyridin, Tetranitromethan und durch

Photooxidation. Jodacetat hemmte selektiv und vollständig das mit GSH vorinkubierte Enzym. Diese Hemmbarkeit vorinkubierter GSH-Peroxidase ließ sich durch Zusatz von Akzeptorsubstrat wieder aufheben, was als Beweis für die selektive Carboxymethylierung einer reduzierten Enzymform und damit als Bestätigung des reaktionsmechanistischen "Ping-Pong-Modells" gewertet wurde. Die Hemmwirkung von Jodacetat auf reduziertes Enzym nahm zwischen pH 6,4 und pH 8,9 stetig ab. Als Ursache der Hemmung durch Tetranitromethan wurde eine oberhalb von pH 8 stark beschleunigte Nitrierung von Tyrosinresten angenommen. Für die photooxidative Hemmung von GSH-Peroxidase konnte zwischen pH 6 und pH 10 keine signifikante Abhängigkeit der Hemmgeschwindigkeit festgestellt werden, ein Indiz, das gegen eine aktive Beteiligung von Histidin am Reaktionsgeschehen gewertet wurde. Für einen Einfluß der Photooxidation auf die spezifische GSH-Bindung am Enzym sprach eine relative Zunahme der Umsatzraten mit unphysiologischen Donorthiolen.

Die Selektivität der Hemmung durch Jodacetat ermöglichte die Titration der reaktiven Zentren von Glutathionperoxidase: reduziertes Enzym wurde mit stöchiometrischen Mengen t-Butylhydroperoxid versetzt und die verbliebene Hemmbarkeit durch Jodacetat als Maß für die Menge aufoxidierten Enzyms verwendet. Auf diese Weise wurden 3,3 aktive Zentren pro Enzymmolekül ermittelt.

Mittels Neutronenaktivierung und quantitativer Auswertung der γ-Spektren konnten 4,0 Grammatome Selen pro Mol Glutathionperoxidase festgestellt werden. Damit wurde dieses essentielle Spurenelement erstmals in definierter Menge in einem kristallinen, funktionellen Protein nachgewiesen.

Da 4 Grammatome Selen pro Enzymmolekül gefunden wurden und die Titration der aktiven Zentren mehr als 3 pro Gesamtmolekül ergab, kann angenommen werden, daß die Untereinheiten (MG = 21 000) des tetrameren Enzyms (MG = 84 000) funktionell äquivalent sind.

Die Aminosäurezusammensetzung von GSH-Peroxidase aus Rinderblut wurde nach p-Toluolsulfonsäure-Hydrolyse mit und ohne Perameisensäure-Vorbehandlung bestimmt. Ein Tyrosin/Tryptophan-Quotient von 1,5 wurde photometrisch ermittelt. Die Bewertung dieser Analysen und der Modifizierungsstudien wurden durch den Selengehalt des Enzyms erschwert. Im Eluat ionenaustauschchromatographisch aufgetrennten p-Toluolsulfonsäure-Hydrolysats ließ sich Selen u.a. in den Elutionsbereichen von Selenocystin und, in geringem Maße, von Selenomethionin nachweisen. Angesichts der ungünstigen Selen-Bilanz dieser Untersuchungen und der Analysenergebnisse vergleichbar behandelter Selenoaminosäure-Cystein-Gemische war eine dezidierte Zuordnung der Selenkomponente noch nicht möglich. Entsprechend sind die quantitativen Angaben über den Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren mit Unsicherheiten behaftet.

Die Diskussion der vorliegenden Arbeit faßt die Konzepte zum kinetischen und chemischen Ablauf der Katalyse von GSH-Peroxidase zusammen. Eine mögliche Beteiligung von Selen am enzymatischen Redoxprozeß wurde an drei Modellvorstellungen diskutiert. Durch die Identifizierung der Glutathionperoxidase als Selenoenzym konnte die Rolle von Selen im biologischen Oxidationsschutz geklärt werden. Da aber nur ein geringer Anteil des zellulären Selens der Glutathionperoxidase zugeordnet werden kann, ist mit weiteren biologischen Funktionen dieses Spurenelements zu rechnen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aebi, H. Heiniger, J. P., Lauber, E., Helv. chim. Acta, 47, 1428 (1964)
2. Agenäs, L. B., in "Organic Selenium Compounds: Their Chemistry and Biology", D. C. Klayman and W. H. H. Günther (Eds.), Wiley-Interscience, New York, (1973) p 180
3. Agenäs, L. B., ibidem, p 206
4. Allaway, W. H., Cornell Vet., 63, 151 (1973)
5. Andreesen, J. R., Ljungdahl, L. G., J. Bacteriol., 116, 867 (1973)
6. Atkins, H. L., Hauser, W., Klopper, J. F., Metabolism, 20, 1052 (1971)
7. Awwad, H. K., Potchen, E. J., Adelstein, S. J. Dealy, J. B., Metabolism, 15, 370 (1966)
8. Awwad, H. K. ElSheraki, A. S., Shetaiwi, S., Helmi, S., Int. J. Appl. Radiat. Isotop., 24, 91 (1973)
9. Azoulay, E., Puig, J., Couchoud-Beaumont, P., Biochim. biophys. Acta, 171, 238 (1969)
10. Azzi, A., Loschen, G., Flohé, L., in "Glutathione", L. Flohé, H.-Ch. Benöhr, H. Sies, H.D. Waller and A. Wendel (Eds.), Thieme Verlag, Stuttgart (1974), p 237
11. Barron, E. S. G., Adv. Enzymol., 11, 201 (1951)
12. Bäuerlein, E., in "Glutathione", L. Flohe, H.-Ch. Benöhr, H. Sies, H. D. Waller and A. Wendel (Eds.), Thieme Verlag, Stuttgart, (1974) p 44
13. Bencze, W. C., Schmid, K., Anal. Chem., 29, 1193 (1957)
14. Bieri, J. G., Nature, 184, 1148 (1959)
15. Blau, M., Biochim. biophys. Acta, 49, 389 (1961)
16. Braganza, J., Critchley, M., Howat, H. T. Testa, H. J. Torrance, H. B., Gut, 14, 383 (1973)
17. Broderius, M. A., Whanger, P. D., Weswig, P. H. J. Nutr., 103, 336 (1973)
18. Brown, D. G., Burk, R. F., Seeley, R. J. Kiker, K. W., Int. J. Vit. Nutr. Res., 42, 588 (1972)
19. Brown, J. H., Pollock, S. H., J. Nutr., 102, 1413 (1972)

20. Bruice, T. C.,Gregory, M. J., Walters, S. L., J. Amer. Chem. Soc., 90, 1612 (1968)
21. Buchanan-Smith, J. G., Nelson, E. C., Tillman, A. D., J. Nutr., 99, 387 (1969)
22. Bull., R. C., Oldfield, J. E., J. Nutr., 91, 237 (1967)
23. Burk, R. F., Consolazio, C. F., Fed. Proc., 31, 692 (1972)
24. Burk, R. F., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 143, 719 (1973)
25. Byard, J. L., Arch. biochem. biophys., 130, 556 (1969)
26. Caldwell, K. A., Tappel, A. L., Biochemistry, 3, 1643 (1964)
27. Caldwell, K. A.,Tappel, A. L., Arch. biochem. biophys., 112, 196 (1965)
28. Calvin, M., in "Glutathione", S. Colowick, A. Lazarow, E. Racker, D. R. Schwarz, E. Stadtman and H. Waelsch (Eds.), Academic Press, New York, (1954) p 3
29. Cary, E. E., Allaway, W. H., Miller, M., J. Anim. Sci. 36, 285 (1973)
30. Caygill, C. P. J., Lucy, J. A., Diplock, A. T., Biochem. J., 125, 407 (1971)
31. Caygill, C. P. J., Diplock, A. T., FEBS Letters, 33, 172 (1973)
32. Christian, G. D., Moritz, M., Invest. Ophthalmol. 5, 248 (1966)
33. Christophersen, B. O.,Biochim. biophys. Acta, 164, 35 (1968)
34. Christophersen, B. O., Biochim. biophys. Acta, 176, 463 (1969)
35. Christophersen, B. O., Biochim. biophys. Acta, 186, 387 (1969)
36. Chow, C. M., Nigam, S. N., McConnell, W. B., Biochim. biophys. Acta, 273, 91 (1972)
37. Chow, C. M., Nigam, S. N., McConnell, W. B., Can. J. Biochem., 51, 489 (1973)
38. Cleland, W. W., Biochim. biophys. Acta, 67, 104 (1963)
39. Coch, E. H., Greene, R. C., Biochim. biophys. Acta, 230, 223 (1971)
40. Cohen, G., Hochstein, P., Biochemistry, 2, 1420 (1963)
41. Cummins, L. M., Martin, J. L., Biochemistry, 6, 3162 (1967)

42. Dalziel, K., Acta Chem. Scand., 11, 1706 (1957)
43. Dalziel, K., Biochem. J., 114, 547 (1969)
44. Dam, H., Glavind, J., Nature, 142, 1077 (1938)
45. Dayhoff, M. D., Eck, R. V., "Atlas of Protein Sequence and Structure", Nat. Biomed. Res. Found., (1967-68) p 90
46. Demus-Oole, A., Swierczewski, E., Minkowski, A., Z. klin. Chem. klin. Biochem., 7, 209 (1969)
47. Denison, G. H., Condit, P. H., Ind. Eng. Chem., 41, 944 (1949)
48. Dickson, R. C., Tomlinson, R. H., Clin. Chim. Acta, 16, 311 (1967)
49. Dickson, R. C., Tappel, A. L., Arch. biochem. biophys. 130, 547 (1969)
50. Dickson, R. C.,Tappel, A. L., Arch. biochem. biophys. 131, 100 (1969)
51. Diplock, A. T., Baum, H., Lucy, J. A., Biochem. J., 123, 721 (1971)
52. Diplock, A. T., Caygill, C. P. J., Jeffery, E. H., Thomas, C., Biochem. J., 134, 283 (1973)
53. Diplock, A. T., Lucy, J. A., FEBS Letters, 29, 205 (1973)
54. Eaton, R. P., Kipnis, D. M., Diabetes, 21, 744 (1972)
55. Ehlig , C. F., Hogue, D. E., Allaway, W. H., Hamm, D. J., J. Nutr., 92, 121 (1967)
56. Engler, R., Lombart, C., Jayle, M. F., Biochem. biophys. Res. Commun., 46, 1483 (1972)
57. Enoch, H. G., Lester, R. L., J. Bacteriol., 110, 1032 (1972)
58. Fee, J. A., Palmer, G., Biochim. biophys. Acta, 245, 175 (1971)
59. Fiske, C. H., SubbaRow, Y., J. biol. Chem., 66, 375 (1925)
60. Flohé, L., Biochemische Diplomarbeit, Tübingen (1966)
61. Flohé, L., Brand, I., Biochim. biophys. Acta, 191, 541 (1969)
62. Flohé, L., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 350, 856 (1969)
63. Flohé, L., Schlegel, W., Schaich, E., Z. klin. Chem. klin. Biochem., 8, 149 (1970)
64. Flohé, L., Brand,I., Z. klin. Chem. klin.Biochem. 8, 156 (1970)
65. Flohé, L., Zimmermann, R., Biochim, biophys. Acta, 223, 210 (1970)

66. Flohé, L., Klin. Wschr., 49, 669 (1971)
67. Flohé, L., Eisele, B., Wendel, A., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 352, 151 (1971)
68. Flohé, L., Günzler, W., Jung, G., Schaich, E., Schneider, F., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 352, 159 (1971)
69. Flohé, L., Schaich, E., Voelter, W., Wendel, A., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 352, 170 (1971)
70. Flohé, L., Schlegel, W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 352, 1401 (1971)
71. Flohé, L., Menzel, H., Plant Cell Physiol., 12, 325 (1971)
72. Flohé, L., in "Fortschr. d. klin. Chem., Enzyme und Hormone", E. Kaiser (Ed.), Verlag der Wiener Med. Akad., Wien, p 97 (1971)
73. Flohé, L., Loschen, G., Günzler, W., Eichele, E., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 353, 987 (1971)
74. Flohé, L., Breitmaier, E., Günzler, W. Voelter, W., Jung, G., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 353, 1159 (1972)
75. Flohé, L., Günzler, W., Schock, H. H., FEBS Letters, 32, 132 (1973)
76. Flohé, L., Günzler, W., in "Glutathione", L. Flohé, H.-Ch. Benöhr, H. Sies, H. D. Waller and A. Wendel (Eds.), Thieme Verlag, Stuttgart, (1974) p 132
77. Flohé, L., Zimmermann, R., ibidem, p 245
78. Freude, K. A., Biochim, biophys. Acta, 167, 485 (1968)
79. Franke, K. W., Potter, V. R., J. Nutr., 10, 213 (1935)
80. Ganther, H. E., Baumann, C. A., J. Nutr., 77, 210 (1962)
81. Ganther, H. E., World Rev. Nutr. Diet. 5, 338 (1965)
82. Ganther, H. E., Biochemistry, 5, 1089 (1966)
83. Ganther, H. E., Biochemistry, 7, 2898 (1968)
84. Ganther, H. E., Corcoran, C., Biochemistry, 8, 2557 (1969)
85. Ganther, H. E., Biochemistry, 10, 4089 (1971)
86. Ganther, H. E., Goudie, E., Sunde, M. L., Kopecky, M. J., Wagner, P., Oh, S. H., Hoekstra, W. G., Science, 175, 1122 (1972)
87. Green, J., Edwin, E. E., Diplock, A. T. Bunyan, J., Biochem. biophys. Res. Commun. 2, 368 (1960)

88. Green, J., Diplock, A. T., Bunyan, J., Edwin, E. E., McHale, D., Nature, 190, 318 (1961)
89. Green, J., Bunyan, J., Nutr. Abstr. Rev., 39, 321 (1972)
90. Green, J., Ann. N. Y. Acad. Sci., 203, 29 (1972)
91. Green, R. C., O'Brien, P. J., Biochim. biophys. Acta, 197, 31 (1970)
92. Gregory, D. J., Robbins, P. W., Ann. Rev. Biochem., 29, 347 (1960)
93. Grosch, W., Senser, F., Fischer, K., Z. Lebensmittel-Unters. und Forschung, 147, 140 (1971)
94. Grosch, W., Senser, F., Fischer, K., Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 1, 214 (1972)
95. Günther, W. H. H., in "Organic Selenium Compounds: Their Chemistry and Biology", D. C. **Klayman** and W. H. H. Günther (Eds.), Wiley-Interscience, New York, (1973) p 11
96. Günzler, W., Biochemische Diplomarbeit, Tübingen (1971)
97. Günzler, W., Vergin, H., Müller, I., Flohé, L., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 353, 1001 (1972)
98. Günzler, W., in "Glutathione", L. Flohé, H. Ch. Benöhr, H.Sies, D. Waller and A. Wendel (Eds.), Thieme Verlag, Stuttgart, (1974) p 180
99. Gundlach, H. G., Stein, W. H., Moore, S., J. biol. Chem., 234, 1754 (1959)
100. Hamilton, J. W., Tappel, A. L., J. Nutr.,79, 493 (1963)
101. Harr, J. R., Exon, J. H., Whanger, P. D., Weswig, P. H., Clin. Toxicol., 5, 187 (1972)
102. Hidiroglou, M., Heany, D. P., Jenkins, K. J., Can. J. Physiol. Pharmacol., 46, 229 (1968)
103. Hidiroglou, M., Jenkins, K, J. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 12, 599 (1972)
104. Hill, C. H., Fed. Proc., 31, 692 (1972)
105. Hirooka, T., Galambos, J. T., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 121, 743 (1966)
106. Hochstein, P., Utley, H., Molec. Pharmacol., 4, 574 (1968)
107. Hoekstra, W. G., Hafemann, D., Oh, S. h., Sunde, R. A., Ganther, H. E., Fed. Proc., 32, 885 (1973)

108. Hoffmann, J. L., McConnell, K. P., Carpenter, D. R., Biochim. biophys. Acta, 199, 531 (1970)
109. Holmberg, N. J., Exp. Eye Res., 7, 570 (1968)
110. Horn, M. J., Jones, B., J. Amer. Chem. Soc., 62, 234 (1940)
111. Horn, M. J., Jones, D. B., J. biol. Chem., 139, 649 (1941)
112. Huber, R. E., Criddle, R. S., Arch. Biochem. Biophys., 122, 164 (1967)
113. Hurlbut, J. A., Martin, J. C., Fed. Proc. 31, 692 (1972)
114. Hurt, D. H., Cary, E. E., Allaway, W. H., Visek, W. J., J. Nutr., 101, 363 (1971)
115. Japha, A., Dissertation, Halle (1842)
116. Jáuregui-Adell, J., Adv. Prot. Chem., 21, 387 (1966)
117. Jenkins, K. J., Can. J. Biochem., 46, 1417 (1968)
118. Jenkins, K. J., Hiridoglou, M., Can. J. Physiol. Pharmacol., 50, 927 (1972)
119. Jenkins, K. J., Hiridoglou, M., Can. J. Animal Sci., 52, 591 (1972)
120. Jocelyn, P. C., "Biochemistry of the SH Group" Academic Press, London, (1972) p XVII
121. Jocelyn, P. C., ibidem, p 96
122. Jori, G., Galiazzo, G., Marzotto, A., Scoffone, E., J. biol. Chem., 243, 4272 (1968)
123. Iwata, H., Okamoto, H., Osahawa, Y., Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 5, 673 (1973)
124. Klayman, D. L., in "Organic Selenium Compounds: Their Chemistry and Biology", D. C. Klayman and W. H. H. Günther (Eds.), Wiley-Interscience, New York, (1973) p 495
125. Klayman, D. L., ibidem, p 124
126. Krishnamurthy, S., Bieri, J. C., Biochem. biophys. Res. Commun., 4, 384 (1961)
127. Kolthoff, J. M., Medalia, A. J., J. Amer. Chem. Soc., 71, 3789 (1949)
128. Kuder, J. E., in "Organic Selenium Compounds: Their Chemistry and Biology", D. C. Klayman and W. H. H. Günther (Eds.), Wiley-Interscience, New York,(1973) p 866

129. Lambeth, D. O., Lardy, H. A., Biochemistry, 8, 3395 (1969)
130. Lavine, T., Fed. Proc., 4, 96 (1945)
131. Lee, D. J., Draper, H. H., Chiu, M., Fed. Proc., 23, 394 (1964)
132. Lee, D. J., Wilson, J. B., Biochim. biophys. Acta, 242, 519 (1971)
133. Lee, M. Dong, A., Yano, J., Can. J. Biochem., 47, 791 (1969)
134. Levander, O. A., Morris, V. C., Higgs, D. J., Fed. Proc., 32, 886 (1973)
135. Little, C., O'Brien, P. J., Biochem. biophys. Res. Commun., 31, 145 (1968)
136. Little, C., Olinescu, R. M., O'Brien, P. J., Biochem. biophys. Res. Commun., 41, 287 (1970)
137. Little, C., Olinescu, R. M., Reid, K. G., O'Brien, P. J., J. biol. Chem., 245, 3632 (1970)
138. Little, C., Biochim. biophys. Acta, 284, 375 (1972)
139. Liu, T. Y., Chang, Y. H., J. biol. Chem., 246, 2842 (1971)
140. Loschen, G., Biochemische Diplomarbeit, Tübingen, (1972)
141. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R.J., J. biol. Chem., 193, 265 (1951)
142. Lunde, G., J. Sci. Food Agr., 23, 987 (1972)
143. Lunde, G., Biochim. biophys. Acta, 304, 76 (1973)
144. Machado, E. A., Hamilton, F., Experientia, 29, 951 (1973)
145. Mahan, D. C., Cline, J. H., Jones, J. E., Cross, R. F., Teague, H. S., Grifo, jr., A. P., J. Anim. Sci., 33, 1151 (1971)
146. Mahler, H. R., Cordes, E. H., "Biological Chemistry", 2nd Ed., Harper and Row, New York, (1971) p 759
147. Martin, J. C., in " Organic Selenium Compounds: Their Chemistry and Biology", D. C. Klayman and W. H. H. Günther (Eds.), Wiley-Interscience, New York, (1973) p 683
148. Martin, J. C., Shrift., A., Gerlach, M. C., Phytochemistry, 10, 945 (1971)
149. Mason, K. E., Young, J. O.,"Selenium in Biomedicine",p 383
150. McConnell, K. P., Wabnitz, C. H., J. biol. Chem., 226, 765 (1957)

151. McConnell, K. P., Fed. Proc., 17, 272 (1958)
152. McConnell, K. P., Roth, D. M., Dallam, R. D., Nature, 183, 183 (1959)
153. McConnell, K.P., Wabnitz, C. H., Roth, D. M., Texas Rept. Biol. Med., 18, 438 (1960)
154. McConnell, K. P., Wabnitz, C. H., Biochim. biophys. Acta, 86, 182 (1964)
155. McConnell, K. P., Cho, G. J.,"Selenium in Biomedicine",(1967
156. McConnell, K. P., Hoffmann, J. L., FEBS Letters, 24, 60 (1972)
157. McCoy, K. E. M., Weswig, P. H., J. Nutr., 98, 383 (1969)
158. Means, G. E., Feeney, R. E, "Chemical Modifications of Proteins", Holden-Day Inc., San Francisco, (1971) p 12
159. Means, G. E., Feeney, R. E., ibidem, p 165
160. Means, G. E., Feeney, R. E., ibidem, p 183
161. Menzel, H., Dissertation, Tübingen, (1973)
162. Millar, K. R., N. Z. J. Agr. Res., 15, 547 (1972)
163. Millar, K. R., Sheppard, A. D., Gardiner, M. A., N. Z. J. Agr. Res., 15, 756 (1972)
164. Millar. K. R., Gardiner, M. A., Sheppard, A. D., N. Z. J. Agr. Res., 16, 115 (1973)
165. Mills, G. C., J. biol. Chem., 229, 189 (1957)
166. Mills, G. C., J. biol. Chem., 234, 502 (1959)
167. Mills, G. C., **Arch. Biochim. Biophys., 86, 1 (1960)**
168. Moore, S., J. biol. Chem., 238, 235 (1963)
169. Morris, V. C., Levander, O. A., Fed. Proc., 31, 691 (1972)
170. Moxon, A. L., Rhian, M., Physiol. Revs., 23, 305 (1943)
171. Mukai, K., Huang, J. J., Kimura, T., Biochem. biophys. Res. Commun., 50, 105 (1973)
172. Neubert, D., Wojtczak, A. B., Lehninger, A. L., Proc. Natl. Acad. Sci. US. 48, 1651 (1962)
173. Nigam, S. N., McConnell, W. B., Phytochemistry, 12, 359 (1973)
174. Nigam, S. N., McConnell, W. B., Biochim. biophys. Acta, 192, 185 (1969)

175. Noguchi, T., Langevin, M. C., Combs,jr., G. F., Scott, M.L., J. Nutr., 103, 444 (1973)
176. Normann, E., Normann, T., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 30, 67 (1972)
177. Ochoa-Solano, A., Gitler, C., J. Nutr., 94, 243 (1968)
178. O'Dell, B. L., Campell, B. J., in "Comprehensive Biochemistry", M. Florkin and E. H. Stotz (Eds.), Vol. 21, Elsevier, New York, (1971) p 240 ff
179. Olcott, H. S., Brown, W. D., Van der Veen, J., Nature, 191, 1201 (1961)
180. Olson, O., Novacek, E., Whitehead, E., Palmer, J., Phytochemistry, 9, 1181 (1970)
181. Orme-Jonson, W. H., Hansen, R. E., Beinert, H., Tsibris, J. C. M., Bartolomaus, R. C., Gunsalus, J. C., Proc. Natl. Acad. Sci. US., 60, 368 (1968)
182. Paglia, D. E., Valentine, W. N., J. Lab. clin. Med., 70, 158 (1967)
183. Painter, E. P., Chem. Rev., 28, 179 (1941)
184. Palmer, J. S., Gunsalus, R. P., Halvorson, A. W., Olson, O. E., Biochim. biophys. Acta, 208, 260 (1970)
185. Pan, F., Natori, Y., Tarver, H., Biochim. biophys. Acta, 93, 521 (1964)
186. Pedersen, N. D., Whanger, P. D., Weswig, P. H., Muth, O. H., Bioinorg. Chem., 2, 33 (1972)
187. Peterson, P. J., Butler, G. W., Austr. J. Biol. Sci., 15, 126 (1962)
188. Pirie, A., Biochem. J., 96, 244 (1965)
189. Pinsent, J., Biochem. J. 57, 10 (1954)
190. Pinto, R. E., Bartley, W., Biochem. J. 112, 109 (1969)
191. Pinto, R. E., Bartley, W., Biochem. J. 114, 5, (1969)
192. Pinto, R. E., Bartley, W., Biochem. J. 115, 449 (1969)
193. Rapoport, S. M., "Medizinische Biochemie" 5. Aufl., Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, (1969) p 618
194. Reynolds, R. J., Aldous, K., "Atomic Absorption Spectroscopy", Griffin, London (1970) p 61
195. Rosenfeld, J., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 111, 670 (1962)

196. Rotruck, J. T., Hoekstra, W. G., Pope, A. L., Nature New Biol., 231, 223 (1971)
197. Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Hoekstra, W. G. J. Nutr., 102, 689 (1972)
198. Rotruck, J. T., Hoekstra, W. G., Pope, A. L., Ganther, H. E. Swanson, A., Hafeman, D., Fed. Proc., 31, 691 (1972)
199. Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D., Hoekstra, W. G., Science, 179, 588 (1973)
200. Rupp, H., Weser, U., persönliche Mitteilung
201. Rupp, H., Biochemische Diplomarbeit, Tübingen, (1973)
202. Sandholm , M., Sipponen, P., Arch. Biochem. Biophys., 155, 120 (1973)
203. Saunders, B. C., Holmes-Siedle A. G., Stark, B. P. "Peroxidase", London, Butterworth's (1964)
204. Schneider, F., Flohé, L., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 384, 540 (1967)
205. Schock, H. H., Z. Anal. Chem., 263. 100 (1973)
206. Schubert, J. R., Muth, O. H., Oldfield, J. E., Remmert, L. F., Fed. Proc., 20, 689 (1961)
207. Schwarz, K., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 78., 852 (1951)
208. Schwarz, K., Foltz, C. M., J. Amer. Chem. Soc., 79, 3293 (1957)
209. Schwarz, K., Bieri, J. G., Briggs, G. M., Scott, C. M., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 95, 621 (1957)
210. Schwarz, K., Stesney, J. A., Foltz, C. M., Metabolism, 8, 88 (1959)
211. Schwarz, K., Mertz, W., Simon, E. J., Biochim. biophys. Acta, 38, 484 (1959)
212. Schwarz, K., Vitamins, Hormones, 20, 463 (1962)
213. Schwarz, K., Lee, C. E., Stesney, J. P., Z. Naturforsch., 17b, 788 (1962)
214. Schwarz, K., Sweeny, P. R., Fed. Proc.,23, 421 (1964)
215. Schwarz, K., Fed. Proc., 24, 58 (1965)
216. Schwarz, K., Fredga, A., J. biol. Chem., 244, 2103 (1969)
217. Schwedt, G., Rüssel, H. A., Chromatographia, 5, 242 (1972)

218. Scott, M. L., in "Organic Selenium Compounds: Their Chemistry and Biology", D. C. Klayman, W. H. H. Günther (Eds.), Wiley-Interscience, New York, (1973) p 634 ff
219. Scott, M. L., ibidem,p 647
220. Scott, M. L., Tompson, J. N., Poultry Sci., 50, 1742 (1971)
221. Shamberger, R. J., Rudolph, G., Experientia, 22, 116 (1966)
222. Shamberger, R. J., J. Natl. Cancer Inst., 44, 931 (1970)
223. Shamberger, R. J., Willis, C. E., Crit. Rev. in Clin. Chem., 2, 211 (1971)
224. Shamberger, R. J., J. Natl. Cancer Inst., 48, 1491 (1972)
225. Shamberger, R. J., Rukovena, E., Longfield, A. K., Tytko, S. S., Deodhar, S., Willis, C. E., J. Natl. Cancer Inst., 50, 863 (1973)
226. Shapiro, J. R., in "Organic Selenium Compounds: Their Chemistry and Biology", D. C. Klayman and W. H. H. Günther (Eds.), Wiley-Interscience, New York, (1973) p 699
227. Shapiro, J. R., ibidem, p 700
228. Shapiro, J. R., ibidem, p 709 ff
229. Shapiro, J. R., ibidem, p 716
230. Shapiro, J. R., ibidem, p 717
231. Shimazu, F., Tappel, A. L., Science, 143, 369 (1964)
232. Shine, R. J., in "Organic Selenium Compounds: Their Chemistry and Biology", D. C. Klayman and W. H. H. Günther (Eds.), Wiley-Interscience, New York (1973) p 224
233. Shrift, A., Amer. J. Botany, 41, 223, (1954)
234. Shrift, A., Plant Physiol., 35, 510 (1960)
235. Shrift, A., Virupaksha, T. K., Biochim. biophys. Acta, 100, 65 (1965)
236. Shrift, A., in "Selenium in Biomedicine", O. H. Muth, Z. E. Oldfield and P. H. Weswig (Eds.), Avi Publishing Co., Westport Conn., (1967)
237. Shum, A. C., Murphy, J. C., J. Bacteriol., 101, 447 (1972)
238. Sies, H., Gerstenecker, C., Menzel, H., Flohé, L., FEBS Letters, 27, 171 (1972)

239. Smyth, D. G., Stein, W. H., Moore, S., J. biol. Chem., 238, 277 (1963)
240. Sondegaard, E., in "Selenium in Biomedicine", O. H. Muth, J. E. Oldfield and P. H. Weswig (Eds.), Avi Publishing Co., Westport Conn., (1967)
241. Srivastava, S. K., Beutler, E., J. biol. Chem., 244, 9 (1968)
242. Stadtman, T. C., Methods in Enzymology, 17A, 959 (1970)
243. Stanton, M. G., Biochem. J., 84, 120 p (1962)
244. Stark, G. R., Stein, W. H., Moore, S., J. biol. Chem., 236, 436 (1961)
245. Sweeney, P. R., Miller, R. B., Brown, R. G., J. Anim. Sci., 33, 1154 (1971)
246. Takahashi, K., Stein, W. H., Moore, S., J. biol. Chem., 242, 4682 (1967)
247. Tang, S. P. W., Spiro, T. S., Mukai, K., Kimura, T., Biochem. biophys. Res. Commun., 53, 869 (1973)
248. Tappel, A. L., Vitamins, Hormones., 20, 493 (1962)
249. Tappel, A. L., Caldwell, K. A., in "Selenium in Biomedicine" O. H. Muth, J. E. Oldfield and P. H. Weswig (Eds.), Avi Publishing Co., Westport Conn., (1967) p 345
250. Taussky, H. H., Washington, A., Zubillaga, E., Nature 210, 949 (1966)
251. Tiselius, A., Hjertén, S., Levin, Ö., Arch. biochim. biophys., 65, 132 (1956)
252. Thomson, C. C., Stewart, R. D. H., Proc. Univ. Otago Med. Sch. 50, 63 (1972)
253. Thompson, J. N., Scott, L. M., J. Nutr., 97, 335 (1969)
254. Ting, K. P., Walker, G. W. R., Genetics, 61, 141 (1969)
255. Toennies, G., Kolb, J. J., J. biol. Chem., 128, 339 (1939)
256. Trelease, S. F., DiSomma, A. A., Jacobs, A. C., Science, 132, 618 (1960)
257. Tribris, J. C. M., Namtvedt, M. J., Gunsalus, J. C., Biochem. biophys. Res. Commun., 30. 323 (1968)
258. Tsen, C. C., Tappel, A. L., J. biol. Chem., 233, 1230 (958)

259. Turner, D. C., Stadtman, T. C., Arch. biochem. biophys., 154, 366 (1973)
260. Tuve, T., Williams, H. H., J. biol. Chem., 236, 597 (1961)
261. Underwood, E. J., "Trace Elements in Human and Animal Nutrition", 2nd ed, Acad. Press, New York, (1962) p 291 ff
262. Underwood, E. J., ibidem, p 308 ff
263. Vickery, H. B., Adv. Prot. Chem., 26, 134 (1972)
264. Walker, G. W. R., Ting, K. P., Can. J. Genet. Cytol., 9, 314 (1967)
265. Warburg, O., Christian, W., Biochem. Z. 310, 384 (1942)
266. Watkinson, J. H., Anal. Chem., 38, 92 (1966)
267. Wattenberg, L. W., J. Natl. Cancer, Inst., 48, 1425 (1972)
268. Weisberger, A. S., Suhrland, L. G., Seifter, J., Blood, 11, 1 (1956)
269. Welch, J. G. Hoekstra, W. G., Pope, A. L., Phillips, P. H., J. Anim. Sci., 19, 620 (1960)
270. Westhead, E. W., Biochemistry, 4, 2139 (1965)
271. Whanger, P. D., Pedersen, N. D., Elliot, D. H., Weswig, P. H., Muth, O. H., J. Nutr., 102, 435 (1972)
272. Whanger, P. D., Biochem. Med., 7, 316 (1973)
273. Whanger, P. D., Pedersen, N. D., Weswig, P. H., Fed. Proc., 31, 691 (1972)
274. Whanger, P. D., Pedersen, N. D., Weswig, P. H., Biochem. biophys. Res. Commun., 53, 1031 (1973)
275. Wright,P. C., in "Selenium in Biomedicine", O. H. Muth, J. E. Oldfield and P. H. Weswig (Eds.), Avi Publishing Co., Westport Conn., (1967)
276. Wu, S. H. Oldfield, J. E., Muth, O. H., Whanger, P. D., Weswig, P. H., Proc. Amer. Soc. Anim. Sci (W. S.), 20, 85 (1969)
277. Zalkin, H., Tappel, A. L., Jordan, J. P., Arch. biochem. biophys., 91, 117 (1960)
278. Zalkin, H., Tappel, A. L., Caldwell, K. A., Shibo, S., Desai, I. D., J. biol. Chem., 237, 2678 (1962)
279. Zeller, E. A., Amer. J. Ophthal., 36, 51 (1953)
280. Zimmermann, R., Dissertation, Tübingen, (1973)

LEBENSLAUF

Am 10. November 1943 wurde ich, Wolfgang Amandus Günzler, als Sohn des im selben Monat in Rußland gefallenen Arztes Dr. Wolfgang Günzler und seiner Ehefrau Rosmarie, geb. Waiblinger, in Tübingen geboren.

Im Herbst 1949 in Tübingen eingeschult, bestand ich im Frühjahr 1954 die Aufnahmeprüfung zur Oberschule. In der Folgezeit besuchte ich nacheinander das Keplergymnasium in Tübingen, die Mittelschule und später das neugegründete Gymnasium in Sulingen (Niedersachsen). Ab Juni 1956 war ich Schüler der Schillerschule in Hannover, eines neusprachlich-naturwissenschaftlichen Gymnasiums, an dem ich im Frühjahr 1963 das Abitur ablegte.

Im Sommersemester 1963 begann ich das Studium der Biochemie an der Universität Tübingen. Den ersten Teil des Vordiploms schloß ich im Frühjahr 1964, den zweiten Teil im Herbst 1967 ab. Die Prüfung zum Hauptdiplom für Biochemiker bestand ich im Mai 1970 in den Fächern Physiologische Chemie, Organische Chemie und Pharmakologie. Zwischen Juli 1970 und Juni 1971 befaßte ich mich im Rahmen meiner Diplomarbeit mit dem Thema: "Weitere Untersuchungen zur Glutathion-Peroxidase (Glutathion:H_2O_2-Oxidoreduktase, EC 1.11.1.9.) aus Rindererythrocyten".

Von Juli 1971 bis September 1973 erarbeitete ich im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. L. Flohé die vorliegende Dissertation.

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren und Dozenten:

Physiologische Chemie	G. Weitzel, F. Schneider
Organische Chemie	E. Müller, E. Bayer, M. Hanack
Anorganische Chemie	W. Rüdorff, E. Stumpp
Physikalische Chemie	G. Kortüm, H. Mauser
Mathematik	W. Schweizer
Physik	H. Krüger
Botanik	E. Bünning, B. Schwemmle

Mikrobiologie	H. Diekmann
Zoologie	K. G. Grell, F. P. Möhres
Anatomie	K. Mörike
Histologie	W. Graumann
Physiologie	K. Brecht, P. Pauschinger
Pharmakologie	H. Remmer, M. Bühler

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
7000 Stuttgart 1, Königstr. 51
Telefon (0711) 29 56 81/29 10 63

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
7000 Stuttgart 1, Königstr. 51
Telefon (0711) 29 56 81/29 10 63